

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**NÍVEIS DE VITAMINA D E PERFIL DE CITOCINAS EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

LAIANA SCHNEIDER

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre 2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**NÍVEIS DE VITAMINA D E PERFIL DE CITOCINAS EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

LAIANA SCHNEIDER

Orientador: Prof. Dr. Odirlei André Monticelo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS,
como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Outubro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Odirlei André Monticielo, meu orientador, pela confiança e apoio, pelas horas disponibilizadas e pelos ensinamentos que influenciaram no meu desenvolvimento acadêmico.

Ao professor Ricardo Machado Xavier, pela contribuição em minha formação acadêmica, um exemplo de pesquisador e profissional dedicado.

A professora Ana Paula Alegretti, minha “mãe científica”, agradeço por estes seis anos de amizade e trabalhos em conjunto, pela significativa contribuição em minha formação profissional e crescimento pessoal.

A todos os professores e médicos do Serviço de Reumatologia que contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

A Bianca Pfaffenseller, pelos ensinamentos e auxílio na parte técnica e prática do trabalho.

Aos alunos de iniciação científica do Ambulatório do Lúpus, que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a Amanda Senna Pereira dos Santos, Marcele dos Santos, Rafael Sassi e Bruno Heemann.

Ao meu noivo, amigo e companheiro Róger, pelas infintas conversas, apoio e paciência. Por me fazer querer melhorar sempre e seguir em busca de minha realização profissional.

As minhas irmãs Larissa e Luana, que apesar da distância acompanharam minha trajetória, questionando, apoiando e incentivando minhas escolhas.

Aos meus amigos, por compreenderem períodos de ausência e pelo carinho e atenção nos momentos de turbulência.

Aos meus pais, por terem me dado uma base sólida e serem meu porto seguro. Pelo apoio e carinho de todas as horas. Não tenho nem palavras para agradecer tudo o que fizeram e fazem por mim. Amo vocês!

A todos aqueles que, embora não nomeados, me engrandeceram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. Estratégias de busca das informações.....	14
2.2. Citocinas	14
2.3. Vitamina D	17
2.3.1. Metabolismo da Vitamina D (Figura 1)	18
2.3.2. Deficiência de Vitamina D	19
2.3.3. Vitamina D e imunorregulação	21
2.4. Lúpus Eritematoso Sistêmico	22
2.4.1. Conceitos, epidemiologia e etiologia	22
2.4.2. Alterações imunológicas no LES	25
2.5. Vitamina D e citocinas no LES	26
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVO	31
4.1. Objetivo geral	31
4.2. Objetivos específicos	31
5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	32
6. ARTIGO DE REVISÃO	46
7. ARTIGO CIENTÍFICO	56
9. ANEXOS	76

ANEXO I - Critérios de classificação do lúpus eritematoso sistêmico.....	76
ANEXO II – Protocolo de avaliação clínica e laboratorial	78
ANEXO III – Ficha de avaliação para dosagem da vitamina D.....	79
ANEXO IV– Protocolo de Citometria de Fluxo	80
ANEXO V – Termo de consentimento livre e esclarecido	86

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D - 1,25-dihidroxitamina D

25(OH)D - 25-hidroxitamina D

ACR - *American College of Rheumatology* (Colégio Americano de Reumatologia)

DC - *dendritic cells* (células dendríticas)

EFSA - *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)

IFN - interferon

IFN- γ - interferon gama

IL - interleucina

kDa - kilodalton

LES - lúpus eritematoso sistêmico

ng/ml - nanograma por mililitro

PTH - paratormônio

SLE - *systemic lupus erythematosus* (lúpus eritematoso sistêmico)

SLEDAI - *systemic lupus erythematosus disease activity index*

SLICC/ACR - *systemic lupus international collaborating clinics / American College of Rheumatology*

TGF- β 1 - *transforming growth factor beta 1* (fator de transformação do crescimento beta1)

Th - *T helper lymphocyte* (linfócito T auxiliar; T CD4+)

TLR - *toll-like receptor* (receptor toll-like)

TNF- α - *tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

UVB - radiação ultravioleta B

VDR - *vitamin D receptor* (receptor da vitamina D)

VDBP - *vitamin D binding protein* (proteína ligante da vitamina D)

VDRE - *vitamin D response element* (elementos de resposta à vitamina D)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Metabolismo da vitamina D e principais efeitos biológicos.....	19
Figura 2 - Vitamina D e imunorregulação.....	22

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a expressão dos perfis de citocinas Th1, Th2 e Th17 em pacientes com LES e verificar possíveis associações com os níveis séricos de vitamina D.

MÉTODOS: Estudo transversal com inclusão de 172 pacientes acompanhados no ambulatório de reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os níveis de vitamina D foram medidos por quimiluminescência. Níveis séricos <20 ng/ml foram considerados como deficiência de vitamina D e níveis ≥ 20 ng/ml foram considerados normais. As citocinas foram medidas no soro após o descongelamento das amostras em uma única ocasião, usando Kit CBA (cytometric beads array) Th1/Th2/Th17.

RESULTADOS: Cento e sessenta e um (94%) pacientes eram mulheres e 128 (74,4%) foram classificados como euro-descendentes. A idade média foi de $40,5 \pm 13,8$ anos e a idade média no momento do diagnóstico foi de $31,5 \pm 13,4$ anos. Na entrada do estudo, os pacientes tiveram mediana (intervalo interquartil) de atividade da doença (SLEDAI- *systemic lupus erythematosus disease activity index*) de 2 (1-4) e cronicidade (SLICC *damage index- systemic lupus international collaborating clinics*) de 0 (0-1). O nível médio de vitamina D foi de $25,4 \pm 11,04$ ng/ml. Cinquenta e nove (34,3%) pacientes apresentavam deficiência de vitamina D e 113 (65,7%) tinham níveis considerados normais. Nenhuma associação e correlação estatisticamente significativa foram encontradas. Os níveis de INF- α e SLEDAI mostraram uma correlação positiva fraca ($r_s=0,22$, $p=0,04$). Análise de regressão linear foi realizada para controlar possíveis fatores de confusão.

CONCLUSÃO: A deficiência de vitamina D é prevalente em pacientes com LES, entretanto, não foram encontradas correlações e associações entre níveis de vitamina D e perfil de citocinas. Confirmamos a correlação existente entre o IFN- α e SLEDAI, conforme a literatura. Efeito *in vitro* de vitamina D no perfil de citocinas não foi reproduzido no presente estudo. Estudos longitudinais podem ajudar a esclarecer a influência da vitamina D na fisiopatogenia do LES.

PALAVRAS-CHAVE: Lúpus eritematoso sistêmico, vitamina D, citocinas, Th1, Th2 e Th17.

ABSTRACT

OBJECTIVES: To evaluate the expression of Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles in SLE patients and verify possible associations with serum vitamin D levels.

METHODS: Cross-sectional study with 172 SLE patients, followed at the outpatient clinic of rheumatology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were included. The levels of vitamin D were measured by chemiluminescence. Serum levels <20 ng/ml were considered as vitamin D deficiency. Normal vitamin D levels were defined as ≥ 20 ng/ml. Cytokines were measured in serum after thawing the samples on a single occasion, using Kit CBA (cytometric beads array) Th1/Th2/Th17.

RESULTS: One hundred sixty one (94%) patients were women and 128 (74.4%) were classified as European derived. The mean age of patients was 40.5 ± 13.8 years and the mean age at diagnosis was 31.5 ± 13.4 years. At the time of study entry, patients had median (IQR) of active disease (SLEDAI- systemic lupus erythematosus disease activity index) of 2 (1-4) and chronicity (SLICC damage index- systemic lupus international collaborating clinics) of 0 (0-1). Mean vitamin D levels were 25.4 ± 11.04 ng/ml. Fifty-nine (34.3%) patients had vitamin D deficiency and 113 (65.7%) had normal levels. No association and statistically significant correlations was found. The levels of INF- α and SLEDAI showed a weak positive correlation ($r_s=0.22$, $p=0.04$). Linear regression analysis was performed to control for possible confounding factors.

CONCLUSION: Vitamin D deficiency is prevalent in patients with SLE, however, no statistically significant correlations and associations between vitamin D levels and cytokine profile were found. We confirm the correlation between IFN- α and SLEDAI, according to the literature. *In vitro* effect of vitamin D on the cytokine profile was not reproduced in this study. Longitudinal studies may help clarify the influence of vitamin D in the pathogenesis of SLE.

KEYWORDS: Systemic lupus erythematosus, vitamin D, cytokines, Th1, Th2 and Th17.

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica com envolvimento multissistêmico. É caracterizada pela produção de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos (1, 2). A etiologia do LES permanece ainda pouco conhecida, porém sabe-se da importante participação de fatores hormonais, ambientais, genéticos e imunológicos para o desencadeamento da doença (3). As características clínicas são polimórficas e a evolução costuma ser crônica, com períodos de exacerbação e remissão (1).

A vitamina D tem efeitos regulatórios em diversos genes, podendo ser um fator extrínseco capaz de afetar a prevalência de doenças autoimunes, tais como o LES. Atua como imunorregulador em diversas células do sistema imune, especialmente linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas (DC) (4, 5). Apresenta papel inibitório na atividade pró-inflamatória de linfócitos T auxiliares (linfócitos T CD4+; *T helper*; Th), e na produção de citocinas, tais como interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (6). A 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH) $_2$ D] também exerce efeito inibitório sobre a proliferação de células Th, podendo alterar o perfil de citocina para o fenótipo Th2, mais anti-inflamatório e imunorregulador (7). Alguns estudos têm mostrado associação entre níveis baixos de vitamina D e LES, sugerindo sua participação na etiopatogenia desta doença (8, 9).

As citocinas são glicoproteínas produzidas principalmente por células T, macrófagos e DC, e atuam na interface entre a imunidade inata e a adquirida. Uma mesma citocina pode ser produzida por mais de um tipo celular e uma única citocina pode apresentar ação em diferentes tipos celulares, dependendo das condições do microambiente onde atua (10, 11). De forma geral, as citocinas possuem ação anti-

inflamatória e pró-inflamatória, cuja função é determinada pelas células imunes que estarão presentes no local e do grau de resposta aos fatores do microambiente que farão a diferenciação de linfócitos T em células de perfil Th1, Th2, Th17 (12, 13).

Estudo *in vitro* demonstrou que a vitamina D inibe a atividade pró-inflamatória de células Th1, impede a diferenciação de células DC, interrompe a proliferação de células B ativadas, aumenta a expressão de células T reguladoras (Tregs) e assim, preserva a resposta imune e a auto-tolerância imunológica. Além disto, altera o perfil de citocinas, aumentando a expressão de TGF- β , IL4, IL5 e IL10 e diminuindo a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 (6, 14). Ocorre supressão das células Th17 envolvidas na autoimunidade e redução da produção de IL-17A, com isso, limita a proliferação de células Th1 (7, 15).

O objetivo do presente estudo foi analisar a associação entre os níveis de vitamina D e o perfil de citocinas em pacientes com LES acompanhados no ambulatório de LES do serviço de reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias de busca das informações

A busca foi realizada na base de dados MEDLINE (site PubMed). Também foi consultado o banco de teses da CAPES e livros-texto. Ainda, teses, dissertações, resumos publicados em anais de congressos e editoriais científicos foram utilizadas como leituras complementares. Os termos utilizados no site PubMed foram “*systemic lupus erythematosus*”, “*systemic lupus erythematosus and vitamin D*” e “*systemic lupus erythematosus and vitamin D and cytokines*”. Foram encontrados 57.884 artigos com o termo “*systemic lupus erythematosus*”, 239 artigos com o termo “*systemic lupus erythematosus and vitamin D*” e 20 artigos com o termo “*systemic lupus erythematosus and vitamin D and cytokines*”.

2.2. Citocinas

As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, entre 6.000 e 60.000 kDa (kilodalton), extremamente potentes que atuam em concentrações muito baixas (10^9 a 10^{-15} M), através da interação específica com receptores de superfície de células alvo, estabelecendo uma interface entre a imunidade inata e a adquirida. Atualmente, já foram descritas mais de 200 diferentes citocinas, pertencentes às famílias de hematopietinas, IFN, quimiocinas e TNF (16, 17).

Embora diversos tipos celulares possam secretar citocinas, as células T, macrófagos e DC são os principais produtores. Uma mesma citocina pode ser produzida por mais de um tipo celular e uma única citocina pode apresentar ação em diferentes tipos celulares, efeito pleiotrópico, dependendo das condições do microambiente. Ainda, as citocinas podem potencializar ou inibir o efeito de outras citocinas,

sinergismo ou antagonismo, respectivamente; a maioria exerce efeitos de maneira parácrina (ação sobre células adjacentes das células produtoras) ou autócrina (ação sobre o tipo celular que a produz) (10, 11, 17, 18).

Poucas citocinas estão presentes normalmente em quantidades detectáveis no sangue. Sua produção é desencadeada quando as células são ativadas por algum estímulo, como agentes infecciosos, estresse ou tumores, e passam a atuar individualmente ou como parte de uma resposta coordenada na sinalização intercelular, promovendo a indução ou regulação não somente das respostas imunes locais e sistêmicas, mas também outros processos biológicos. As citocinas desempenham papel fundamental na diferenciação e na ativação dos diferentes subtipos de linfócitos T. Esta ativação de subpopulações de células T resulta na secreção de diversas citocinas que irão determinar o perfil da resposta imune (19). A diferenciação de linfócitos Th em Th1 ocorre na presença de IL-12 e IFN- γ que determinam um perfil pró-inflamatório (20), enquanto que a diferenciação em Th2 ocorre na presença de IL-4 e IL-10 e determina um perfil mais anti-inflamatório. Os linfócitos Tregs são produtores de TGF- β e IL-10, que apresentam capacidade de supressão e regulação da resposta imune. As células Th17 são caracterizadas pela produção de IL-17, IL-21 e IL-22, que estão associadas a um perfil pró-inflamatório (13, 21).

O perfil Th1 participa da imunidade mediada por células e da imunidade mediada por anticorpos, é essencial para o controle de patógenos intracelulares, como vírus e bactérias, por exemplo, *Listeria* e *Mycobacterium tuberculosis*. Fornece uma espécie de “ajuda” mediada por citocinas para linfócitos T citotóxicos e parece ser responsável pelo componente celular da resposta imune. A resposta inflamatória Th1 produz IL-2, IL-3, IL-12, TNF- β e IFN (α , β e γ) (22).

A resposta de citocinas Th2 proporciona auxílio para as células B e são essenciais para a produção de anticorpos IgE e também participam na produção de algumas subclasses de IgG. Estes anticorpos produzidos são necessários para controlar organismos patogênicos extracelulares que, ao contrário dos parasitas intracelulares, são expostos a anticorpos no sangue e outros fluidos corporais. Ainda, fornecem auxílio no controle de processos inflamatórios exacerbados. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que são responsáveis pelo componente humoral da resposta imune (23, 24).

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos, mas em menor grau, também por células T, células B e fibroblastos. Os seus efeitos inflamatórios são muitos e variados, incluindo a ativação da secreção de citocinas e quimiocinas, produção de moléculas de adesão endotelial, migração de células imunes, supressão de atividade das Tregs, ativação de osteoclastos e reabsorção de osso e cartilagem (25). Estudo com estimulação de células apresentadoras de antígenos com lipopeptídeos e células T, mostrou que a secreção de TNF- α e IL-17 está associada com pior prognóstico em doenças autoimunes (26). As células Th17 são caracterizadas por serem linfócitos CD4⁺ que expressam o fator de transcrição *orphan nuclear hormone receptor* (ROR γ T). Estas células secretam IL-17 que tem papel fundamental na iniciação e manutenção da resposta inflamatória e na estimulação de produção de outras citocinas pró-inflamatórias. Estas células contribuem para a defesa contra bactérias extracelulares e são importantes no desenvolvimento de doenças alérgicas, e parecem estar envolvidas na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, como psoríase, dermatite de contato e LES (7).

A IL-12 é produzida e ativada por DC e macrófagos. Ela é considerada uma citocina imunoestimulatória pela função que exerce sobre a produção e secreção de

outras citocinas como $\text{INF-}\gamma$, células exterminadoras naturais (*natural killers*- NK) e células T. A IL-12 possui moléculas heterodiméricas: IL-12p70 e IL-12p40. A IL-12p70 proporciona a diferenciação das células T helper que tem o papel de proteger as células contra qualquer organismo externo, enquanto a IL-12p40 pode antagonizar a IL-12 e inibir geração de linfócitos T citotóxicos, *in vitro* (27, 28).

De forma geral, as citocinas possuem ação anti-inflamatória e pró-inflamatória, cuja função é determinada pelas células imunes que estarão presentes no local e do grau de resposta aos fatores do microambiente. Respostas a diferentes estímulos podem exercer um descontrole no balanço de citocinas Th1, Th2, e Th17. Esta perturbação pode ter implicações fundamentais para o curso clínico de muitas infecções e doenças autoimunes.

2.3. Vitamina D

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o metabolismo dos seres vivos. A vitamina D compreende compostos lipossolúveis de origem vegetal (vitamina D₂ ou ergocalciferol) ou animal (vitamina D₃ ou colecalciferol). O papel desta vitamina na manutenção da homeostase do cálcio e fósforo é reconhecido há décadas (29). No entanto, a descoberta da participação da vitamina D na homeostase do sistema imunológico, assim como a existência de receptores de vitamina D (VDR) em vários tecidos e células e a capacidade destas de transformar 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] no metabólito mais ativo, 1,25(OH)₂D, parecem impulsionar a redescoberta desta molécula para um futuro promissor (30). Existem evidências da influência desta vitamina na fisiopatogênese de doenças autoimunes, metabolismo ósseo, neoplasias, doenças infecciosas e cardiovasculares (29, 31, 32).

2.3.1. Metabolismo da Vitamina D (Figura 1)

A vitamina D apresenta pequena atividade biológica intrínseca, necessitando de sucessivas hidroxilações para tornar-se ativa (33). A principal fonte de vitamina D é a produção endógena a partir da luz ultravioleta e apenas uma pequena quantidade é obtida a partir da dieta. A luz ultravioleta do sol (UVB 290-315 nm) em uma reação não enzimática converte o 7-deidrocolesterol endógeno em pré-vitamina D na pele. Quando há exposição prolongada à luz solar, ocorre degradação de 75-80% destas moléculas em produtos inertes. A pré-vitamina D sofre isomerização em vitamina D, conhecido como colecalciferol. Após a síntese na pele, a vitamina D entra na circulação e é transportada para o fígado ligada à proteína ligante da vitamina D (Vitamin D-binding protein-VDBP) (34).

A vitamina D a partir da dieta é absorvida no intestino delgado e também é transportada ao fígado pela VDBP e em menor quantidade pela albumina (35), onde sofre a primeira hidroxilação para 25(OH)D, conhecida como calcidiol. O fígado é o reservatório usual de vitamina D e a 25(OH)D representa o principal metabólito circulante desta vitamina (35, 36). Nos rins, a 25(OH)D é hidroxilada pela enzima 1 α -hidroxilase à 1,25(OH)₂D, também conhecida como calcitriol que é o produto mais ativo, e uma pequena parcela é hidroxilada à 24,25-desidroxivitamina D [24,25(OH)₂D], pela enzima α -hidroxilase, que é um metabólito hidrossolúvel inativo, também conhecido como ácido calcitróico, que é excretado na bile. Esta última etapa é estimulada pelo paratormônio (PTH), e suprimida pela concentração de fosfato e pelos níveis séricos de 1,25(OH)₂D (34, 35, 37). Recentemente, 1 α -hidroxilase tem sido descrita em alguns tecidos como a próstata, pulmões, placenta, paratireóide, cólon, células β -pancreáticas, e ainda, em células do sistema imunológico, tornando possível a produção local de vitamina D ativa, que passa a ter efeito parácrino/autócrino (4, 38).

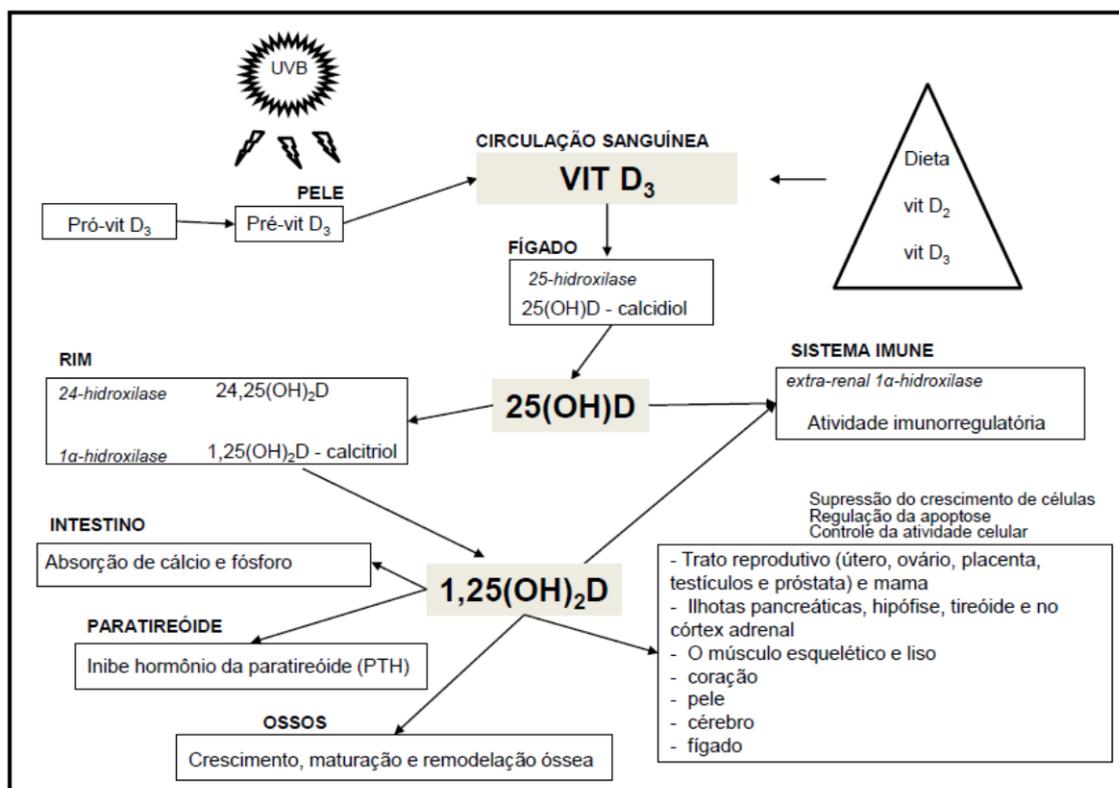


Figura 1: Metabolismo da vitamina D e principais efeitos biológicos.

2.3.2. Deficiência de Vitamina D

O diagnóstico de hipovitaminose D depende da determinação dos níveis séricos de 25(OH)D, mas não há consenso sobre os valores a serem adotados. Vários especialistas concordaram em definir a deficiência de vitamina D a partir dos níveis séricos de 25(OH)D inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L), levando em consideração a variação regulatória do PTH que, no caso de deficiência de vitamina D, aumenta de forma compensatória, o que estimula o rim a aumentar a produção de 1,25(OH)₂D. Deste modo, quando ocorre deficiência de vitamina D e queda nos níveis de 25(OH)D, a concentração sérica de 1,25(OH)₂D se mantém dentro dos níveis normais ou mesmo elevados (39). A insuficiência de vitamina D é definida quando os níveis séricos se mantêm entre 21-29 ng/mL, sendo considerada suficiente quando os níveis forem iguais ou superiores a 30 ng/mL (75 nmol/L). Acredita-se que valores mais elevados não confirmam benefícios adicionais aos indivíduos (40). No entanto, as concentrações ideais

de 25(OH)D necessários para o bom funcionamento do sistema imunológico não estão bem definidos e estudos vêm demonstrando que alguns polimorfismos genéticos envolvendo a proteína ligadora da vitamina D, enzimas envolvidas em seu metabolismo, e o próprio receptor da vitamina D (VDR- *vitamin D receptor*) podem determinar variações nos níveis séricos e tornar ainda mais complexa a determinação da concentração ideal de vitamina D (41-43).

A ingestão diária de vitamina D depende de hábitos alimentares e estratégias de suplementação através de medicamentos ou alimentos enriquecidos. Atualmente, não há consenso internacional sobre a dose ideal para a suplementação de vitamina D. O Instituto de Medicina dos Estados Unidos (IOM) considera segura a suplementação de 600 UI/dia até os 70 anos e 800 UI/dia para indivíduos com mais de 70 anos (40), já a Sociedade de Endocrinologia considera como limite máximo tolerável 1.000 UI/dia (44). Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA- *European Food Safety Authority*) recomenda suplementação abaixo de 4.000 UI/dia (45). A administração do calcitriol, metabólito altamente ativo, deve ser criteriosamente avaliada, pois pode causar efeitos colaterais, em particular hipercalcemia. Uma análise de perspectiva global demonstrou que 6 a 47% do consumo de vitamina D podem vir de suplementos alimentares (46). Consequentemente, sem suplementação, os níveis de vitamina D dependem da produção endógena, que é influenciada por determinantes genéticos, etnia, latitude, uso concomitante de medicamentos, estação do ano, pigmentação da pele, estilo de vida, uso de protetor solar, tipo de vestuário e outros fatores que ainda podem ser desconhecidos (33, 47).

2.3.3. Vitamina D e imunorregulação

As primeiras evidências de que a vitamina D determina regulação positiva da imunidade inata surgiram de relatos de casos sobre o tratamento da tuberculose com o óleo de fígado de bacalhau, onde foi observado que o calcitriol aumentava os efeitos antimicrobianos de macrófagos, além de aumentar a quimiotaxia e capacidade fagocítica (48, 49). Mais tarde, a descoberta do VDR em células do trato reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículo e próstata), mamas, sistema endocrinológico (ilhas pancreáticas, hipófise, tireóide, paratireóide e córtex adrenal), musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro e fígado, sugeriu a possível participação vitamina D em outras funções regulatórias do organismo que não somente relacionadas com o metabolismo ósseo (50). A partir destas descobertas, houve um avanço nas pesquisas sobre as propriedades imunomodulatórias da vitamina D.

Ambos os sistemas imunitário inato e adaptativo apresentam uma grande variedade de células, tais como macrófagos, DC, células T e células B, que expressam VDR. No entanto, sua maior concentração está em células imunológicas imaturas no timo e nos linfócitos T CD8 maduros, independentemente do seu estado de ativação (5) e, portanto, podem responder a forma biologicamente ativa da vitamina D (51). Estudos *in vitro* demonstraram que a vitamina D inibe atividade pró-inflamatória de células Th1, e a produção de citocinas, tais como IL-2, interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (6, 14). A 1,25(OH) $_2$ D exerce efeito inibitório sobre a proliferação de células T, podendo alterar o perfil de citocina para o fenótipo Th2, mais anti-inflamatório e imunorregulador (Figura 2) (7, 15, 52). Estas propriedades imunológicas levaram à investigação de um possível papel nos mecanismos patogênicos de doenças autoimunes como LES, esclerose múltipla (EM) e diabetes melito tipo 1 (DM1) (53-55).

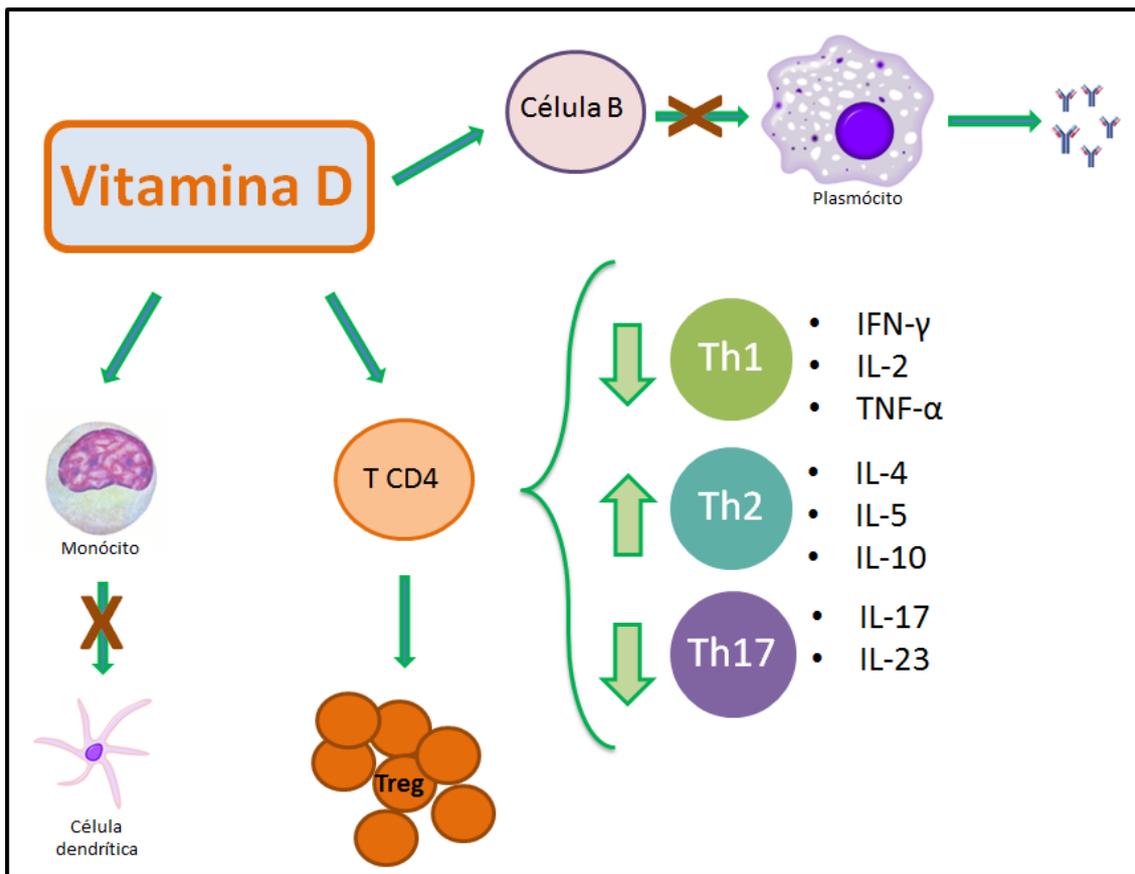


Figura 2: Vitamina D e imunorregulação. A vitamina D atua na regulação e diferenciação de células T CD4, fazendo com que aumente a proliferação de células Treg, atuando na manutenção da autotolerância imunológica e controle das respostas autoimunes. Impede a diferenciação de monócitos em células dendríticas. Atua na troca do fenótipo Th1 para Th2, com maior tolerância imunológica; diminui expressão das células Th17 envolvidas na autoimunidade e redução da produção de IL-17 e IL-23; Estímulo à atividade de células Tregs; interrupção da diferenciação de células B e inibição da produção de imunoglobulinas.

2.4. Lúpus Eritematoso Sistêmico

2.4.1.1. Conceitos, epidemiologia e etiologia

O LES é uma doença inflamatória crônica, autoimune, que pode apresentar grande variação na etiologia, patogênese, manifestações clínicas, laboratoriais, evolução e prognóstico. Geralmente, há predomínio de acometimento cutâneo, articular e alterações imunológicas, com formação e deposição de imunocomplexos (1, 2).

O LES apresenta frequência cerca de 6 a 10 vezes maior em mulheres do que em homens entre as idades de 14 a 65 anos e menor quando a idade for abaixo ou acima destes limites, sugerindo um papel importante dos fatores hormonais na sua etiopatogênese. Ainda, evidências sugerem que o LES é mais frequente em afroamericanos, índios nativos norteamericanos e em orientais, quando comparado com caucasoides (56).

A prevalência do LES nos Estados Unidos varia entre 15 e 50 casos para cada 100.000 habitantes (57, 58), já na Europa varia entre 12 e 68 casos para cada 100.000 habitantes (59, 60). Estas oscilações podem ser resultado de variações genéticas, aspectos socioeconômicos e metodologias utilizadas nos estudos. Os relatos de prevalência do LES têm aumentado nas últimas décadas, o que pode ser devido aos avanços nos testes diagnósticos que tem possibilitado identificação mais precoce da doença e também devido ao aumento da sobrevida destes pacientes (61). A incidência varia com determinadas características da população como gênero, período estudado e etnia. Estudos estimam uma incidência anual entre 1,8 e 7,6 casos para cada 100.000 habitantes/ano nos EUA (58). Já na Europa, a incidência varia de 2,2 casos para cada 100.000 habitantes/ano na Espanha e até 4 casos para cada 100.000 habitantes/ano na Inglaterra (62, 63). No Brasil, um estudo realizado no Paraná apresentou uma taxa de incidência de 4,8 casos para cada 100.000 habitantes/ano (64) e um estudo realizado no Rio Grande do Norte apresentou incidência de 8,7 casos para cada 100.000 habitantes/ano (65).

O diagnóstico baseia-se em critérios clínicos e laboratoriais manifestados ao longo da evolução da doença. O Colégio Americano de Reumatologia (*ACR- American College of Rheumatology*) estabeleceu critérios de classificação diagnóstica em 1982 que foram revisados em 1997, onde pelo menos quatro dos 11 critérios devem ser

satisfeitos para um paciente ser classificado com LES. Estes critérios estão detalhados no anexo I (66-68). A evolução da doença não é uniforme e o curso é caracterizado por períodos de remissão e exacerbação. A apresentação clássica é de lesões cutâneas, nefrite, artrite, úlceras orais e autoanticorpos positivos (1).

A etiologia ainda não está completamente entendida, mas se acredita que seja necessária predisposição genética interagindo com fatores hormonais, ambientais e infecciosos, levando à quebra da tolerância imunológica e culminando na formação de autoanticorpos contra diversos autoantígenos (3, 20). Já foram identificados mais de 30 polimorfismos genéticos que contribuem para a ativação da imunidade inata e adaptativa que atuam no processo inflamatório da doença. A maioria dos pacientes é fotossensível à radiação ultravioleta, onde a exposição aos raios UVB pode não só causar uma exacerbação de lesões de pele, mas também pode agravar o acometimento sistêmico e induzir a produção de anticorpos anti-DNA nativo (69). Os autoanticorpos mais prevalentes são os anticorpos antinucleares, anti-DNA, anti-Ro, anti-La e anticardiolipinas (70).

Os objetivos do tratamento são controlar o processo inflamatório, melhorar sintomas e preservar a função dos diferentes órgãos e tecidos. Os medicamentos utilizados no tratamento incluem analgésicos, anti-inflamatórios não hormonais, corticosteróides, imunomoduladores, imunossupressores, medicações imunobiológicas alvo-específicas, além de cuidados gerais (65, 71, 72). Pior prognóstico se associa ao acometimento renal, do sistema nervoso central, do aparelho cardiovascular e hematopoiético. Com a evolução do tratamento houve redução das lesões em órgãos nobres e aumento da sobrevida, mas as complicações infecciosas ainda são preocupantes. Alguns estudos demonstraram que existe uma mortalidade elevada em pacientes com LES, de quatro à cinco vezes maior que na população geral (73, 74).

2.4.2. Alterações imunológicas no LES

Os pacientes com LES apresentam anticorpos contra diversos autoantígenos. Os anticorpos mais prevalentes são dirigidos contra antígenos nucleares, detectados em mais de 95% dos pacientes (3). Expressão anômala de moléculas coestimulatórias nas interações entre célula apresentadoras de antígeno e entre linfócitos T e B desencadeia fenômenos de autoimunidade. Isto resulta na formação de autoanticorpos e, subsequentemente, imunocomplexos, com ativação do sistema complemento, inflamação crônica e lesão tecidual (75). A detecção destes autoanticorpos pode ser feita pela realização da pesquisa do FAN e também pela detecção de autoanticorpos específicos.

Produção de autoanticorpos contra eritrócitos, plaquetas, linfócitos, fatores de coagulação e fosfolípidos também pode ser vista em pacientes com LES. Anormalidades hematológicas são comumente encontradas, sendo anemia e linfopenia as alterações mais frequentes. A linfopenia está presente particularmente durante a doença ativa e é fortemente associada com crioglobulinas IgM, fixação do complemento e anticorpos anti-linfócitos (70, 76). A identificação destes anticorpos é importante para caracterizar a doença, pois existe associação entre a expressão do anticorpo e algumas manifestações clínicas. Um exemplo disto é a presença de glomerulonefrite ativa em pacientes com altos títulos de anti-DNA nativo, especialmente o isotipo IgG (77-79).

Os autoanticorpos são produzidos por linfócitos B autorreativos que apresentam falha na maquinaria de tolerância durante o desenvolvimento celular e assim, ocorre uma redução no número de células B virgens e um aumento de plasmócitos secretores de imunoglobulinas que estão correlacionadas com a atividade da doença (80, 81). A ativação excessiva dos linfócitos B resulta em uma hiperativação dos linfócitos T, que por sua vez faz com que pacientes com LES apresentem um perfil

aberrante na produção de citocinas secretadas pelos linfócitos Th, comprometendo a capacidade efetora pró-inflamatória e anti-inflamatória, bem como alterações no mecanismo de apoptose e deficiência nos mecanismos de depuração de material apoptótico e de imunocomplexos (20).

Os linfócitos Tregs estão em quantidade menor e são funcionalmente anormais no LES (82). Enquanto que estudos evidenciaram aumento de expressão de IL-6 e IL-21, estas citocinas inflamatórias estão presentes na diferenciação de células T em células Th17, secretoras de IL-17 (83, 84). O número de células Th17 encontra-se significativamente elevado no plasma de pacientes com LES (85). A IL-17 e a IL-23 apresentam elevada atividade pró-inflamatória e encontram-se anormalmente aumentadas no LES, sendo correlacionadas com maiores índices de atividade de doença (77, 86). As células Th17, importantes fontes de IL-17, estão presentes nos rins de pacientes com nefrite lúpica. O aumento de IL-17 pode amplificar a resposta imune por aumento de dano e inflamação em órgão alvo e por estimular a produção de anticorpos (87, 88).

Pacientes com LES apresentam uma maior expressão de genes regulados por IFN em células mononucleares do sangue periférico, o que é conhecido como “assinatura de interferon”, sugerindo um possível papel do IFN- α na patogênese do LES (89). Esta citocina estimula a atividade citotóxica de linfócitos T CD8+. O IFN- α causa a diferenciação e ativação de DC e estimula produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- α e IL-6, aumentando ainda mais a resposta imune (90, 91).

2.5. Vitamina D e citocinas no LES

A vitamina D apresenta efeitos imunorregulatórios em diversas células do sistema imune, especialmente linfócitos T, linfócitos B e DC (4, 5). Alguns estudos têm

mostrado associação entre níveis baixos de vitamina D e LES, sugerindo sua participação na etiopatogenia desta doença (8). A associação entre a vitamina D e o LES foi descrita pela primeira vez em 1979 (92). Há evidências de que a vitamina D administrada *in vitro* reduz a chance de desenvolver doença autoimune em modelos murinos experimentais de encefalite e lúpus (93). Estudo brasileiro, realizado em 2000, com camundongos geneticamente predispostos a desenvolver LES, apresentou piores achados histopatológicos na biópsia renal no grupo que recebeu suplementação de vitamina D, sugerindo que a vitamina D pudesse ter atuado como fator agravante da doença. Estes dados não foram reproduzidos em outros estudos (94).

Vários estudos em todo o mundo tem relatado que a deficiência desta vitamina é mais prevalente entre pacientes com LES do que na população geral (95). Uma possível explicação para isso seria a recomendação universal de fotoproteção feita a estes pacientes. Além disto, muitas medicações, dentre elas os glicocorticóides e a hidroxicloroquina, poderiam interferir no metabolismo da vitamina D e determinar alteração nos níveis séricos de 25(OH)D. Estudos tem sugerido que a deficiência de vitamina D pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença (96). No entanto, a ingestão de vitamina D não foi associada com o risco de desenvolver LES em uma coorte prospectiva de mulheres que avaliou ingestão de vitamina D na adolescência e o desenvolvimento de LES na idade adulta (97). Alguns estudos tem demonstrado uma associação entre maior atividade da doença e baixos níveis séricos de vitamina D (96), mas os resultados são controversos. A vitamina D e seus análogos podem estar envolvidos na prevenção do desenvolvimento de doenças autoimunes, mas também poderiam ser utilizados no tratamento destas (98). A vitamina D pode também ser considerada um potencial agente anti-inflamatório e imunossupressor. A deficiência de

vitamina D parece ter associação com anormalidades imunológicas no LES, o que sugere desempenhar um papel na produção de autoanticorpos (9).

A deficiência de vitamina D apresenta uma associação com índices de atividade e cronicidade da doença e algumas manifestações clínicas do LES. Entretanto, existem discrepâncias nas diferentes populações estudadas. Isso pode estar interligado a fatores de confusão relacionados anteriormente. Além disto, o papel dos polimorfismos do gene VDR permanece incerto, uma vez que há pouca evidência sobre a sua influência na ação da vitamina D (95, 99). Recentemente, estudo mostrou que os níveis de 25(OH)D foram significativamente maiores em pacientes portadores do genótipo f/f do polimorfismo *FokI* em pacientes com LES, mesmo após ajuste para os conhecidos fatores de confusão (95).

A deficiência de vitamina D altera a resposta imunológica para a perda da tolerância. A adição de vitamina D *in vitro* parece inverter anormalidades imunológicas características do LES. Estudo concluiu que a 1,25(OH)₂D inibe a maturação de células dendríticas e ativação das células Th17 e aumenta das células Treg (100). Outro estudo, com suplementação de colecalciferol em cultura de células, demonstrou que a expressão de IFN- γ e IL-17 foi diminuída, indicando que o aumento de 25(OH)D no soro está associado á diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T (101, 102).

Estudo randomizado incluindo 267 pacientes com LES que receberam suplementação de colecalciferol 2000 UI/dia ou placebo por via oral, durante 12 meses demonstrou que níveis mais baixos de 25(OH)D estão correlacionados com maior atividade da doença. Após 12 meses de tratamento, houve uma melhora significativa nos níveis de marcadores de inflamação e hemostáticos, bem como da atividade da

doença no grupo de tratamento comparado com o grupo placebo, mostrando uma tendência à melhora clínica subsequente (103).

Até o momento, existem mais de uma centena de estudos sobre LES e vitamina D. Os pesquisadores destes estudos tem buscado estabelecer a prevalência de deficiência de vitamina D e sua importância em vários aspectos clínicos da doença, tais como a atividade da doença, os danos crônicos associados à doença e parâmetros clínicos e laboratoriais. Uma questão ainda em aberto e que precisa ser respondida é se a deficiência de vitamina D realmente predispõe ao surgimento da doença e altera sua evolução e prognóstico.

3. JUSTIFICATIVA

O papel da vitamina D como imunomodulador não está totalmente entendido e os estudos existentes apresentam desfechos clínicos e laboratoriais com resultados controversos. Estudos avaliando a influencia da vitamina D e o perfil de expressão de citocinas em pacientes com LES ainda são escassos. Portanto, analisar a associação entre os níveis de vitamina D e de citocinas é importante para entendermos melhor o papel da vitamina D na imunomodulação *in vivo* dos pacientes com LES e consequentemente suas implicações clínicas, uma vez que o dano tecidual causado pela atividade de citocinas pró-inflamatórias é responsável pelas manifestações observadas na doença.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo geral

Avaliar a associação entre os níveis de vitamina D e o perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 em pacientes com LES.

4.2. Objetivos específicos

1- Determinar a quantidade de citocinas Th1 (IL-2, INF, TNF- α e IL-12, IL-12p70), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), Th17 (IL-17, IL-21), presente no soro de pacientes com LES.

2- Determinar a concentração de 25-hidroxivitamina D em pacientes com LES.

3- Verificar a existência de correlação entre atividade da doença (SLEDAI) e cronicidade (SLICC *damage index*), níveis de vitamina D e níveis das citocinas estudadas.

4- Verificar se os níveis séricos de citocinas estão correlacionados com níveis de complemento (C3 e C4) e anti-DNA nativo.

5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2007;369(9561):587-96.
2. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Freitas JP, Marques Gomes M, Filipe P. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis*. 2012;2012:834291.
3. Herrmann M, Winkler T, Gaipl U, Lorenz H, Geiler T, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(1):28-35.
4. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
5. Arnsen Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(9):1137-42.
6. Alroy I, Towers TL, Freedman LP. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol*. 1995;15(10):5789-99.
7. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(1):23-33.

8. Kamen D, Aranow C. Vitamin D in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20(5):532-7.
9. Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, Kamen DL, Macwana SR, Roberts VC, et al. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(9):1569-74.
10. Barnes A. Measurement of serum cytokines. *Lancet.* 1998;352(9124):324-5.
11. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
12. Kyttaris VC, Tsokos GC. T lymphocytes in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(5):548-52.
13. Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17-producing T cells in lupus. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22(5):499-503.
14. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol.* 1985;134(5):3032-5.
15. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th₂ cells. *J Immunol.* 2001;167(9):4974-80.
16. Keen LJ. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol.* 2002;10(2-3):143-6.

17. Abul K. Abbas MBBS AHHLMP, Shiv Pillai MD. Cellular and Molecular Immunology. 7e, editor2011.
18. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*. 2000;127(2):117-26.
19. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:227-57.
20. Kytтары VC, Juang YT, Tsokos GC. Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17(5):518-22.
21. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(4):742-80.
22. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):6-21.
23. Shih DQ, Targan SR, McGovern D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Curr Gastroenterol Rep*. 2008;10(6):568-75.
24. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1341-6.
25. Yu SL, Kuan WP, Wong CK, Li EK, Tam LS. Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:715190.

26. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol.* 2000;165(11):6107-15.
27. Akimoto T, Akama T, Tatsuno M, Saito M, Kono I. Effect of brief maximal exercise on circulating levels of interleukin-12. *Eur J Appl Physiol.* 2000;81(6):510-2.
28. Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. Total serum IL-12 and IL-12p40, but not IL-12p70, are increased in the serum of older subjects; relationship to CD3(+) and NK subsets. *Cytokine.* 2000;12(2):156-9.
29. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1678S-88S.
30. vinh quốc Lu'o'ng K, Nguyễn LT. The beneficial role of vitamin D in obesity: possible genetic and cell signaling mechanisms. *Nutr J.* 2013;12:89.
31. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81.
32. Grant WB. Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(1):65-79.
33. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):1080S-6S.
34. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008;29(6):726-76.

35. Premaor MO, Furlanetto TW. [Vitamin D deficiency in adults: to better understand a new presentation of an old disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(1):25-37.
36. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev.* 2008;66(10 Suppl 2):S182-94.
37. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D₃ 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science.* 1997;277(5333):1827-30.
38. Cross HS. Extrarenal vitamin D hydroxylase expression and activity in normal and malignant cells: modification of expression by epigenetic mechanisms and dietary substances. *Nutr Rev.* 2007;65(8 Pt 2):S108-12.
39. Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C, Gao P, Cantor T, Forette F, et al. Vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(7):3086-90.
40. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):53-8.
41. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229(11):1136-42.

42. McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(1-2):471-7.
43. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(3):315-25.
44. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911-30.
45. Vero V, Gasbarrini A. The EFSA health claims 'learning experience'. *Int J Food Sci Nutr.* 2012;63 Suppl 1:14-6.
46. Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(6):1357-64.
47. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr.* 2013;52(2):429-41.
48. Grad R. Cod and the consumptive: a brief history of cod-liver oil in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharm Hist.* 2004;46(3):106-20.
49. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(4):482-96.

50. DeLuca HF. New concepts of vitamin D functions. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;669:59-68; discussion -9.
51. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(8):404-12.
52. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JW, et al. Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmun Rev.* 2011;10(12):733-43.
53. Kragt J, van Amerongen B, Killestein J, Dijkstra C, Uitdehaag B, Polman C, et al. Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Mult Scler.* 2009;15(1):9-15.
54. de Boer IH, Sachs MC, Cleary PA, Hoofnagle AN, Lachin JM, Molitch ME, et al. Circulating vitamin D metabolites and kidney disease in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):4780-8.
55. Robinson-Cohen C, Hoofnagle AN, Ix JH, Sachs MC, Tracy RP, Siscovick DS, et al. Racial differences in the association of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with coronary heart disease events. *JAMA.* 2013;310(2):179-88.
56. Lau CS, Yin G, Mok MY. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus.* 2006;15(11):715-9.
57. Balluz L, Philen R, Ortega L, Rosales C, Brock J, Barr D, et al. Investigation of systemic lupus erythematosus in Nogales, Arizona. *Am J Epidemiol.* 2001;154(11):1029-36.

58. Furst DE, Clarke AE, Fernandes AW, Bancroft T, Greth W, Iorga SR. Incidence and prevalence of adult systemic lupus erythematosus in a large US managed-care population. *Lupus*. 2013;22(1):99-105.
59. Lerang K, Gilboe I, Garen T, Thelle DS, Gran JT. High incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in Norway. *Lupus*. 2012;21(12):1362-9.
60. Ståhl-Hallengren C, Jönsen A, Nived O, Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol*. 2000;27(3):685-91.
61. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwok CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum*. 1995;38(9):1260-70.
62. Alonso MD, Llorca J, Martinez-Vazquez F, Miranda-Filloo JA, Diaz de Teran T, Dierssen T, et al. Systemic lupus erythematosus in northwestern Spain: a 20-year epidemiologic study. *Medicine (Baltimore)*. 2011;90(5):350-8.
63. López P, Mozo L, Gutiérrez C, Suárez A. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus*. 2003;12(11):860-5.
64. Nakashima CA, Galhardo AP, Silva JF, Fiorenzano GR, Santos AB, Leite MF, et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. *Rev Bras Reumatol*. 2011;51(3):231-9.
65. Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*. 2002;11(8):528-32.

66. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
67. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25(11):1271-7.
68. Edworthy SM, Zatarain E, McShane DJ, Bloch DA. Analysis of the 1982 ARA lupus criteria data set by recursive partitioning methodology: new insights into the relative merit of individual criteria. *J Rheumatol.* 1988;15(10):1493-8.
69. Lehmann P, Homey B. Clinic and pathophysiology of photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2009;8(6):456-61.
70. Liu CC, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013;5(4):210-33.
71. Alarcón GS, McGwin G, Petri M, Reveille JD, Ramsey-Goldman R, Kimberly RP, et al. Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: PROFILE. *Lupus.* 2002;11(2):95-101.
72. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 1993;72(2):113-24.

73. Jiménez S, Cervera R, Font J, Ingelmo M. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2003;25(1):3-12.
74. Cervera R, Font J. [Activity or inactivity: is this the question in systemic lupus erythematosus?]. *Med Clin (Barc)*. 1993;101(7):255-7.
75. Shirai T, Hirose S. Molecular pathogenesis of SLE. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28(2):79-82.
76. Dijstelbloem HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RH, Oost WW, Jansen MD, et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum*. 2000;43(12):2793-800.
77. López-Pedrera C, Aguirre M, Barbarroja N, Cuadrado MJ. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010.
78. Gröndal G, Gunnarsson I, Rönnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2000;18(5):565-70.
79. Pavlovic M, Kats A, Cavallo M, Chen R, Hartmann JX, Shoenfeld Y. Pathogenic and Epiphenomenal Anti-DNA Antibodies in SLE. *Autoimmune Dis*. 2011;2011:462841.
80. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005;201(5):703-11.

81. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2000;165(10):5970-9.
82. Crispin JC, Vargas MI, Alcocer-Varela J. Immunoregulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2004;3(2):45-51.
83. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature.* 2008;454(7202):350-2.
84. Wong CK, Wong PT, Tam LS, Li EK, Chen DP, Lam CW. Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *J Clin Immunol.* 2010;30(1):45-52.
85. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol.* 2008;127(3):385-93.
86. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol.* 2009;10(7):778-85.
87. Crispín JC, Tsokos GC. IL-17 in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:943254.

88. Yap DY, Lai KN. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:365083.
89. Obermoser G, Pascual V. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010;19(9):1012-9.
90. Blanco P, Pitard V, Viillard JF, Taupin JL, Pellegrin JL, Moreau JF. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005;52(1):201-11.
91. Ding D, Mehta H, McCune WJ, Kaplan MJ. Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2006;177(9):5878-89.
92. O'Regan S, Chesney RW, Hamstra A, Eisman JA, O'Gorman AM, Deluca HF. Reduced serum 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ levels in prednisone-treated adolescents with systemic lupus erythematosus. *Acta Paediatr Scand.* 1979;68(1):109-11.
93. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity.* 1992;12(2):143-8.
94. Vaisberg MW, Kaneno R, Franco MF, Mendes NF. Influence of cholecalciferol (vitamin D₃) on the course of experimental systemic lupus erythematosus in F1 (NZBxW) mice. *J Clin Lab Anal.* 2000;14(3):91-6.

95. Monticielo OA, Teixeira TeM, Chies JA, Brenol JC, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2012;31(10):1411-21.
96. Kamen DL, Aranow C. The link between vitamin D deficiency and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*. 2008;10(4):273-80.
97. Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito-Garcia E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(4):530-5.
98. Hiraki LT, Munger KL, Costenbader KH, Karlson EW. Dietary intake of vitamin D during adolescence and risk of adult-onset systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(12):1829-36.
99. Ruiz-Irastorza G, Gordo S, Olivares N, Egurbide MV, Aguirre C. Changes in vitamin D levels in patients with systemic lupus erythematosus: Effects on fatigue, disease activity, and damage. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(8):1160-5.
100. Wahono CS, Rusmini H, Soelistyoningsih D, Hakim R, Handono K, Endharti AT, et al. Effects of 1,25(OH)₂D₃ in immune response regulation of systemic lupus erythematosus (SLE) patient with hypovitamin D. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(1):22-31.
101. Drozdenko G, Scheel T, Heine G, Baumgrass R, Worm M. Impaired T cell activation and cytokine production by calcitriol-primed human B cells. *Clin Exp Immunol*. 2014.

102. Drozdenko G, Heine G, Worm M. Oral vitamin D increases the frequencies of CD38+ human B cells and ameliorates IL-17-producing T cells. *Exp Dermatol.* 2014;23(2):107-12.

103. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial. *J Rheumatol.* 2013;40(3):265-72.

6. ARTIGO REVISÃO

“Vitamina D e Lúpus Eritematoso Sistêmico: o estado da arte”

Laiana Schneider¹, Marcele Santos², Rafael Sassi³, Odirlei André Monticielo⁴.

1. MSc, Division of Rheumatology. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
2. Estudante de medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
3. Estudante de medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
4. MSc, Division of Rheumatology. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Correspondence to:

Odirlei André Monticielo, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 645
Zip code 90035-003 - Porto Alegre, Brazil
Fone: +55 51 3359 8340
E-mail: omonticielo@yahoo.com.br

“Vitamina D e Lúpus Eritematoso Sistêmico: o estado da arte”

Schneider L^a, Santos SO^a, Sassi R^a, Monticielo OA^a.

^aServiço de Reumatologia; Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Apoio Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE).

Artigo de Revisão

Vitamina D e Lúpus Eritematoso Sistêmico: o estado da arte

Resumo

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória sistêmica cuja susceptibilidade está associada a fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos. Um destes fatores tem sido identificado como deficiência de vitamina D. A vitamina D exerce inúmeras ações sobre o sistema imunológico, e diversos estudos tem sugerido um potencial papel no desenvolvimento de doenças autoimunes. Pacientes com LES apresentam baixos níveis séricos de vitamina D, o que aumenta a possibilidade de associação entre a deficiência de vitamina e o aparecimento da doença. Esta revisão discute aspectos relacionados com os efeitos imunorregulatórios da vitamina D e sua importância no LES, bem como as recomendações para suplementação de vitamina D nestes pacientes.

Palavras-chave: Vitamina D, Lúpus Eritematoso Sistêmico, 25-hidroxivitamina D, deficiência, suplementação.

Introdução

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o metabolismo dos seres vivos. A vitamina D compreende compostos lipossolúveis de origem vegetal (vitamina D₂ ou ergocalciferol) ou animal (vitamina D₃ ou colecalciferol). O papel desta vitamina na manutenção da homeostase do cálcio e fósforo é reconhecido há décadas (1). No entanto, a descoberta da participação da vitamina D na homeostase do sistema imunológico, assim como a existência de receptores de vitamina D (VDR) em vários tecidos e células, e a capacidade destas de transformar 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] no metabólito mais ativo, 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D], parecem impulsionar a redescoberta desta molécula para um futuro promissor (2). Existem evidências da influência desta vitamina na patogênese de doenças autoimunes, metabolismo ósseo, neoplasias, doenças infecciosas e cardiovasculares (1, 3, 4).

Metabolismo da Vitamina D

A vitamina D apresenta pequena atividade biológica intrínseca, necessitando de sucessivas hidroxilações para tornar-se ativa (5). A principal fonte de vitamina D é a produção endógena a partir da luz ultravioleta e apenas uma pequena quantidade é

obtida a partir da dieta. A luz ultravioleta do sol (UVB 290-315 nm) em uma reação não enzimática converte o 7-deidrocolesterol endógeno em pré-vitamina D, quando há exposição prolongada à luz solar, ocorre degradação de 75-80% das moléculas em produtos inertes. A pré-vitamina D sofre isomerização em vitamina D, conhecido como colecalciferol. Após a síntese na pele, a vitamina D₃ entra na circulação e é transportada para o fígado unida à proteína ligante da vitamina D (VDBP) (6).

A vitamina D a partir da dieta é absorvida no intestino delgado e também é transportada ao fígado pela VDBP e em menor quantidade pela albumina (7), onde sofre a primeira hidroxilação para 25(OH)D, conhecida como calcidiol. O fígado é o reservatório usual de vitamina D e a 25(OH)D representa o principal metabólito circulante desta vitamina (7, 8). Nos rins, a 25(OH)D é hidroxilada pela enzima 1 α -hidroxilase à 1,25-(OH)₂D, também conhecida como calcitriol que é o produto mais ativo, e uma pequena parcela é hidroxilada à 24,25-desidroxivitamina D [24,25(OH)₂D], pela enzima α -hidroxilase, que é um metabólito hidrossolúvel inativo, também conhecido como ácido calcitróico, que é excretado na bile. Esta última etapa é estimulada pelo paratormônio (PTH), e suprimida pela concentração de fosfato e pelos níveis séricos de 1,25(OH)₂D (6, 7, 9). Recentemente, 1 α -hidroxilase tem sido descrita em alguns tecidos como a próstata, pulmões, placenta, paratireoide, cólon, células β -pancreáticas, e ainda, em células do sistema imunológico, tornando possível a produção local de vitamina D ativa, que passa a ter efeito parácrino/autócrino (10, 11).

Deficiência de Vitamina D

O diagnóstico de hipovitaminose D depende da determinação dos níveis séricos de 25(OH)D, mas não há consenso sobre os valores a serem adotados. Vários especialistas concordaram em definir a deficiência de vitamina D a partir níveis séricos de 25(OH)D inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L), levando em consideração as variação regulatória do PTH. A insuficiência de vitamina D é definida quando os níveis séricos se mantêm entre 21-29 ng/mL, sendo considerada suficiente quando os níveis forem iguais ou superiores a 30 ng/mL (75 nmol/L). Acredita-se que valores mais elevados não confirmam benefícios adicionais aos indivíduos (12). No entanto, as concentrações ideais de 25(OH)D necessários para o bom funcionamento do sistema imunológico não estão bem definidos e estudos vêm demonstrando que alguns polimorfismos genéticos envolvendo a proteína ligadora da vitamina D, enzimas envolvidas em seu metabolismo,

e o próprio VDR podem determinar variações nos níveis séricos e tornar ainda mais complexa a determinação da concentração ideal de vitamina D (13-15).

A ingestão diária de vitamina D depende de hábitos alimentares e estratégias de suplementação através de medicamentos ou alimentos enriquecidos. Atualmente, não há consenso internacional sobre a dose ideal para a suplementação de vitamina D. O Instituto de Medicina dos Estados Unidos (IOM) considera segura a suplementação de 600 UI/dia até os 70 anos e 800 UI/dia para indivíduos com mais de 70 anos (12), já a Endocrine Society considera como limite máximo tolerável 1.000 UI/dia (16). The European Food and Safety Authority recomenda suplementação abaixo de 4.000 UI/dia (17). A administração do calcitriol, metabólito altamente ativo, deve ser criteriosamente avaliada, pois pode causar efeitos colaterais, em particular hipercalcemia. Uma análise de perspectiva global demonstrou que 6 a 47% do consumo de vitamina D podem vir de suplementos alimentares (18). Consequentemente, sem suplementação, os níveis de vitamina D dependem da produção endógena, que é influenciada por determinantes genéticos, etnia, latitude, uso concomitante de medicamentos, estação do ano, pigmentação da pele e estilo de vida, tais como o uso de protetor solar e roupas (5, 19).

Vitamina D e imunorregulação

As primeiras evidências de que a vitamina D determina regulação positiva da imunidade inata surgiram de relatos de casos sobre o tratamento da tuberculose com o óleo de fígado de bacalhau, onde observaram que o calcitriol aumentava os efeitos antimicrobianos de macrófagos, além de aumentar a quimiotaxia e capacidade fagocítica (20, 21). Mais tarde, a descoberta do VDR em células do trato reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículo e próstata), mamas, sistema endócrino (ilhotas pancreáticas, hipófise, tireóide, paratireóide e córtex adrenal), musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro e fígado, sugeriu a possível participação da vitamina D em outras funções regulatórias do organismo que não somente relacionadas com o metabolismo ósseo (22). A partir destas descobertas, houve um avanço nas pesquisas sobre as propriedades imunomoduladoras da vitamina D.

Ambos os sistemas imunitário inato e adaptativo apresentam uma grande variedade de células, tais como macrófagos, células dendríticas, células T e células B, que expressam VDR. No entanto, sua maior concentração está em células imunológicas imaturas no timo e nos linfócitos T CD8 maduros, independentemente do seu estado de ativação (23) e, portanto, podem responder a forma biologicamente ativa da vitamina D

(24). Estudos *in vitro* demonstraram que a vitamina D inibe atividade pró-inflamatória de células Th1, e a produção de citocinas, tais como IL-2, interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (25, 26). A 1,25(OH) $_2$ D exerce efeito inibitório sobre a proliferação de células T, podendo alterar o perfil de citocina para o fenótipo Th2, mais anti-inflamatório e imunorregulador (27). Estas propriedades imunológicas levaram à investigação de um possível papel nos mecanismos patogênicos de doenças autoimunes como no lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla (EM) e diabetes melito tipo 1 (DM1).

Vitamina D e o LES

Estudos com modelos animais tem mostrado associação da vitamina D e LES. Há evidências de que a vitamina D administrada *in vitro* reduz a chance de desenvolver doença autoimune em modelos murinos experimentais de encefalite e lúpus (28). Estudo brasileiro, realizado em 2000, com camundongos geneticamente predispostos a desenvolver LES, apresentou piores achados histopatológicos na biópsia renal no grupo que recebeu suplementação de vitamina D, sugerindo que a vitamina D pudesse ter atuado como fator agravante da doença. Estes dados não foram reproduzidos em outros estudos (29).

A associação entre a vitamina D e o LES foi descrita pela primeira vez em 1979 (30). Vários estudos em todo o mundo tem relatado que a deficiência desta vitamina é mais prevalente entre pacientes com LES do que na população geral (31). Uma possível explicação para isso seria a recomendação universal de fotoproteção feita a estes pacientes. Além disto, muitas medicações, dentre elas os glicocorticoides e a hidroxicloroquina, poderiam interferir no metabolismo da vitamina D e determinar alteração nos níveis séricos de 25(OH)D. Estudos tem sugerido que a deficiência de vitamina D pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença (32). No entanto, a ingestão de vitamina D não foi associada com o risco de desenvolver LES em uma coorte prospectiva de mulheres (33). Alguns estudos tem demonstrado uma associação entre maior atividade da doença e baixos níveis séricos de vitamina D (32), mas os resultados são controversos. Recentemente, estudo americano realizado com uma coorte de enfermeiras, não observou associação entre ingestão de vitamina D na adolescência e o desenvolvimento de LES na idade adulta (34). A vitamina D e seus análogos podem estar envolvidos na prevenção do desenvolvimento de doenças autoimunes, mas também poderiam ser utilizados no tratamento destas. A vitamina D

pode também ser considerada um potencial agente anti-inflamatório e imunossupressor. A deficiência de vitamina D parece ter associação com anormalidades imunológicas no LES, o que sugere desempenhar um papel na produção de auto-anticorpos (35).

A deficiência de vitamina D apresenta uma associação com índices de atividade e cronicidade da doença e algumas manifestações clínicas do LES. Entretanto, existem discrepâncias nas diferentes populações estudadas. Isso pode estar interligado a fatores de confusão relacionados anteriormente. Além disto, o papel dos polimorfismos do gene VDR permanece incerto, uma vez que há pouca evidência sobre a sua influência na ação da vitamina D (31). Recentemente, estudo mostrou que os níveis de 25(OH)D foram significativamente maiores em pacientes portadores do genótipo f/f do polimorfismo FokI em pacientes com LES, mesmo após ajuste para os conhecidos fatores de confusão (31).

Até o momento, existem mais de uma centena de estudos sobre LES e vitamina D. Os pesquisadores destes estudos tem buscado estabelecer a prevalência de deficiência de vitamina D e sua importância em vários aspectos clínicos da doença, tais como a atividade da doença, os danos crônicos associados à doença e parâmetros clínicos e laboratoriais. Uma questão ainda em aberto e que precisa ser respondida é se a deficiência de vitamina D realmente altera o curso e prognóstico do LES.

Suplementação de vitamina D em paciente com LES

A suplementação de vitamina D em pacientes com LES vem sendo estudada, buscando modificar desfechos clínicos, com resultados ainda inconsistentes. Ruiz-Irastorza et al., em um estudo observacional, avaliaram os efeitos terapêuticos da suplementação oral de vitamina D no LES. Após 2 anos de tratamento, verificaram aumento dos níveis de 25(OH)D em todos os pacientes. No entanto, 71% destes ainda apresentavam níveis insuficientes de vitamina D e não houve redução dos índices de atividade de doença (36). Petri *et al.*, estudaram 1.006 pacientes por 128 semanas. Na primeira visita, 763 pacientes (76%) apresentaram dosagem de 25(OH)D <40 ng/ml, sendo que 85% destes eram Afro-descendentes. Estes pacientes receberam suplementação com 50.000 unidades de vitamina D₂ (ergocalciferol) semanalmente. Ao final do estudo, os autores não encontraram qualquer benefício clínico em manter os níveis séricos de 25(OH)D acima de 40 ng/ml (37).

Estudo randomizado controlado por placebo com 267 pacientes, avaliou biomarcadores inflamatórios e hemostáticos, além de índice de atividade da doença,

antes e depois da suplementação oral de 200 UI de colecalciferol por dia, por um período de 12 meses. No início do estudo a média de 25(OH)D era de 19,8 ng/ml nos pacientes e 28,7 ng/ml nos controles. A prevalência de insuficiência (10-30 ng/ml) ou deficiência (<10 ng/ml) de vitamina D no início do estudo foi de 69% e 39%, respectivamente. Ao final de 12 meses de suplementação, houve uma melhora significativa nos níveis dos marcadores inflamatórios e hemostáticos bem como da atividade da doença no grupo de tratamento comparado com o grupo placebo (38).

A vitamina D atuando na imunomodulação de citocinas inflamatórias pode ter efeitos cardioprotetores. Kiani et. al. avaliando se baixos níveis de vitamina D podem prever mudanças nas medidas subclínicas da aterosclerose ou da PCR ultra-sensível (hsCRP), estudou uma amostra de 200 pacientes incluídos no estudo Lupus Atherosclerosis Prevention, durante 2 anos. Os autores encontraram que a dosagem de 25(OH)D variou entre 4-79 ng/ml e não foi associada com qualquer medida subclínica da aterosclerose. A deficiência de vitamina D foi associada com maiores valores de hsCRP no início do estudo, mas não previu uma mudança na hsCRP após 2 anos (39).

Existem ensaios clínicos em andamento que testam a segurança e a eficácia de diferentes doses de vitamina D em pacientes com LES e, ainda, se a vitamina D pode ser utilizada como um tratamento e/ou prevenção de LES. (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00418587?term=%22vitamin+D%22+AND+%22lupus%22&rank=3>) Estudo semelhante pretende avaliar o impacto de diferentes doses de vitamina D₃ na expressão de interferon alfa (IFN-alfa). (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00710021?term=%22vitamin+D%22+AND+%22lupus%22&rank=2>) As doses mais estudadas como tratamento de suplementação são de 800 UI/dia, 2000 UI/dia e 4000 UI/dia.

Enquanto não tivermos resultados mais concisos a respeito da suplementação de vitamina D, muitos especialistas continuarão recomendando corrigir a deficiência de vitamina D. A dose necessária para atingir e manter níveis adequados de 25(OH)D depende do nível sérico inicial, sendo que, para elevar 1 ng/ml de 25(OH)D no soro, é necessário cerca de 100 UI/dia de ingestão de vitamina D, e que leva aproximadamente 3 meses para alcançar um estado de equilíbrio uma vez que a suplementação é iniciada (40). Ainda, as respostas individuais podem variar e os fatores de risco conhecidos para a suplementação, devem ser levados em conta.

Conclusão

Deficiência de vitamina D associa-se com o LES e parece interferir em aspectos clínicos tanto de atividade quanto de cronicidade de doença. Entretanto, estudos de suplementação parecem não demonstrar melhora clínica dos pacientes com LES. Ensaio clínico ainda são necessários para determinar como a suplementação de vitamina D afetaria *in vivo* a fisiopatologia do LES e como poderia contribuir para imunomodulação e tratamento da doença. Ainda é preciso definir a dosagem ideal de suplementação e se há necessidade de monitoramento pelos níveis séricos de 25(OH)D. Seria a vitamina D somente um epifenômeno ou realmente alteraria a suscetibilidade, o curso e o prognóstico do LES?

Referencias

1. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1678S-88S.
2. vinh quốc Lu'o'ng K, Nguyễn LT. The beneficial role of vitamin D in obesity: possible genetic and cell signaling mechanisms. *Nutr J.* 2013;12:89.
3. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81.
4. Grant WB. Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(1):65-79.
5. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):1080S-6S.
6. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008;29(6):726-76.
7. Premaor MO, Furlanetto TW. [Vitamin D deficiency in adults: to better understand a new presentation of an old disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(1):25-37.
8. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev.* 2008;66(10 Suppl 2):S182-94.
9. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science.* 1997;277(5333):1827-30.
10. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
11. Cross HS. Extrarenal vitamin D hydroxylase expression and activity in normal and malignant cells: modification of expression by epigenetic mechanisms and dietary substances. *Nutr Rev.* 2007;65(8 Pt 2):S108-12.
12. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):53-8.
13. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229(11):1136-42.
14. McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(1-2):471-7.
15. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(3):315-25.
16. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911-30.
17. Vero V, Gasbarrini A. The EFSA health claims 'learning experience'. *Int J Food Sci Nutr.* 2012;63 Suppl 1:14-6.
18. Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(6):1357-64.

19. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr.* 2013;52(2):429-41.
20. Grad R. Cod and the consumptive: a brief history of cod-liver oil in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharm Hist.* 2004;46(3):106-20.
21. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(4):482-96.
22. DeLuca HF. New concepts of vitamin D functions. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;669:59-68; discussion -9.
23. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(9):1137-42.
24. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(8):404-12.
25. Alroy I, Towers TL, Freedman LP. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol.* 1995;15(10):5789-99.
26. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol.* 1985;134(5):3032-5.
27. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(1):23-33.
28. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity.* 1992;12(2):143-8.
29. Vaisberg MW, Kaneno R, Franco MF, Mendes NF. Influence of cholecalciferol (vitamin D3) on the course of experimental systemic lupus erythematosus in F1 (NZBxW) mice. *J Clin Lab Anal.* 2000;14(3):91-6.
30. O'Regan S, Chesney RW, Hamstra A, Eisman JA, O'Gorman AM, Deluca HF. Reduced serum 1,25-(OH)₂ vitamin D3 levels in prednisone-treated adolescents with systemic lupus erythematosus. *Acta Paediatr Scand.* 1979;68(1):109-11.
31. Monticeli OA, Teixeira TeM, Chies JA, Brenol JC, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2012;31(10):1411-21.
32. Kamen DL, Aranow C. The link between vitamin D deficiency and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;10(4):273-80.
33. Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito-Garcia E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(4):530-5.
34. Hiraki LT, Munger KL, Costenbader KH, Karlson EW. Dietary intake of vitamin D during adolescence and risk of adult-onset systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(12):1829-36.
35. Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, Kamen DL, Macwana SR, Roberts VC, et al. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(9):1569-74.
36. Ruiz-Irastorza G, Gordo S, Olivares N, Egurbide MV, Aguirre C. Changes in vitamin D levels in patients with systemic lupus erythematosus: Effects on fatigue, disease activity, and damage. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010;62(8):1160-5.
37. Petri M, Bello KJ, Fang H, Magder LS. Vitamin D in systemic lupus erythematosus: modest association with disease activity and the urine protein-to-creatinine ratio. *Arthritis Rheum.* 2013;65(7):1865-71.
38. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial. *J Rheumatol.* 2013;40(3):265-72.
39. Kiani AN, Fang H, Magder LS, Petri M. Vitamin D deficiency does not predict progression of coronary artery calcium, carotid intima-media thickness or high-sensitivity C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(11):2071-6.
40. Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(7):3149-51.

7. ARTIGO CIENTÍFICO

Vitamin D levels and cytokine profiles in patients with systemic lupus erythematosus

Laiana Schneider¹, Antônio Carlos Colar da Silva², Luiz Carlos Werres Junior², Ana Paula Alegretti², Amanda Senna Pereira dos Santos³, Marcele Santos³, Rafael Sassi³, Bruno Heemann³, Bianca Pfaffenseller⁴, João Carlos Tavares Brenol⁵, Odirlei André Monticielo⁵.

1. Master in Medical Sciences, Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2. Clinical Pathology Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

3. Graduate medical student, Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

4. PhD student in Biochemistry, Molecular Psychiatry Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

5. Professor of Medicine, Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Corresponding author:

Prof. Odirlei Andre Monticielo

Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2350, room 645

ZIP Code 90035-003 - Porto Alegre, Brazil

Telephone: +55 51 3359 8340

E-mail: omonticielo@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the expression of Th1, Th2 and Th17 cytokines in patients with SLE, and verify the association between cytokine levels and serum vitamin D concentration.

Methods: The sample consisted of 172 patients with SLE. 25-hydroxyvitamin D [(25(OH)D)] levels were measured by chemiluminescence. 25(OH)D levels <20 ng/ml were considered to reflect vitamin D deficiency. Serum cytokine levels were measured in once-thawed samples, using a Th1/Th2/Th17 CBA (cytometric beads array) kit.

Results: One hundred sixty one (94%) patients were women and 128 (74.4%) were of European-derived. Mean patient age was 40.5±13.8 years, and mean age at diagnosis was 31.5±13.4 years. At the time of study entry, patients had a median (IQR) SLEDAI of 2 (1-4) and SLICC of 0 (0-1). Mean 25(OH)D concentration was 25.4±11.04 ng/ml. Fifty-nine (34.3%) patients had a vitamin D deficiency. No statistically significant associations were identified between cytokine and vitamin D levels. The most significant finding was a positive correlation between INF- α levels and SLEDAI ($r_s=0.22$, $p=0.04$).

Conclusion: Although vitamin D deficiencies are highly prevalent in patients with SLE, vitamin D levels were not significantly associated with patient cytokine profiles. The positive correlation between IFN- α levels and SLEDAI showed in this study corroborates other findings in the literature. The present results did not replicate those of in vitro studies of the effect of vitamin D levels on cytokine profiles. Placebo-controlled intervention trials of the effect of vitamin D on cytokine profiles are still required before any definitive conclusions can be drawn regarding the association between these variables.

Keywords: vitamin D, 25-hydroxyvitamin D, systemic lupus erythematosus, SLE, cytokines, Th1, Th2, Th17.

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease with diverse clinical manifestations which affects several different organ and systems. SLE occurs mostly in women of fertile age, and has an approximate incidence of 2-8 cases per 100,000 people (1). Patients with this condition develop T and B-cell mediated autoimmune responses characterized by the production of autoantibodies (2). The autoimmune mechanisms responsible for the disease and the factors which contribute to its onset and progression are only poorly known.

Vitamin D is a hormone produced in the skin and metabolized by the liver and kidneys. Although its main function is to regulate calcium homeostasis in bone cells, its effect on vitamin D receptors (VDR) also characterize it as an immunomodulator (3). VDR are expressed in a wide variety of cells in the innate and adaptive immune systems, such as macrophages, dendritic cells, and T and B cells (4). However, the highest concentration of these receptors is found in the immature immune cells of the thymus and in mature CD8 T lymphocytes, regardless of their activation state (5). Therefore, these cells may also respond to the biologically active form of vitamin D (6). Vitamin D deficiency has been considered one of the main environmental contributors to the development of autoimmune diseases. Studies show that patients with SLE have a higher prevalence of vitamin D deficiency than the general population (7). Low vitamin D levels appear to be inversely associated with the activity and chronicity of SLE (7-9), although these results are still controversial. Vitamin D levels have also been associated with immunological abnormalities and changes in the expression of T-helper cells and B cells, suggesting that this vitamin may play a role in autoantibody production and in the clinical manifestations of SLE (10).

The imbalance of helper T cells has been found to play an important role in the pathogenesis of SLE. The differentiation of T helper (Th) cells is influenced by their medium and local cytokine environment. These cells are then classified as Th1, Th2 or Th17, according to the type of cytokines they produce. There are cytokines that are considered to be central within each group, such as Th1 cells produce interferon γ (IFN- γ), whereas Th2 cells are characterized by expression of interleukin-4 (IL-4). Th17 cells have only recently been described, and are characterized by their ability to produce IL-17A (11). *In vitro* studies have shown that vitamin D inhibits the proinflammatory

activity of Th1 cells, prevents the differentiation of dendritic cells, interrupts the proliferation of activated B cells, and increases the expression of regulatory T cells (Treg), preserving the immune response and maintaining self-tolerance (4, 12, 13). Vitamin D has also been found to alter cytokine profiles, increasing TGF- β , IL4, IL5 and IL10 expression, while decreasing the production of IFN- γ , TNF- α and IL-12 (14, 15). Additionally, vitamin D inhibits the Th17 responses involved in autoimmunity and reduces the production of IL-17A, suppressing the proliferation of Th1-cells, and, at times, shifting the cytokine profile to Th2 (2, 16).

The immunomodulating effects of vitamin D may result in an increase or decrease in the levels of pro and anti-inflammatory cytokines, which may, in turn, alter the course of SLE, influencing disease activity and chronicity. In the present study, we evaluated the expression of Th1, Th2 and Th17 cytokines in patients with SLE, and the possible association between Th cell profiles and serum vitamin D levels in these individuals.

MATERIALS AND METHODS

POPULATION STUDIED

This was a cross-sectional study of a convenience sample of 172 patients diagnosed with SLE according to American College of Rheumatology (ACR) revised criteria for the classification of SLE (17), seen at the Rheumatology Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Patients with the following conditions were excluded from the study: other autoimmune conjunctive tissue diseases, save for secondary antiphospholipid syndrome and Sjogren's syndrome; lymphoproliferative disease; cancer; active infections; HIV, HBV or HCV positivity. The present study was approved by the Research Ethics Committee of the HCPA, and all participants provided written consent prior to study enrollment.

CLINICAL AND LABORATORY VARIABLES

A standardized questionnaire was used to investigate the following variables at the time of recruitment: age, gender, skin phototype, smoking status, alcohol

consumption, body mass index (BMI), use of oral vitamin D supplementation and treatment with hydroxychloroquine, corticosteroids and immunosuppressants drugs. Clinical manifestations of SLE included photosensitivity, malar or discoid rashes, oral or nasal ulcers, arthritis, serositis (pleuritis or pericarditis), nephritis and neurological disorders (seizures or psychosis). The laboratory evaluation included diagnostic tests for blood disorders (hemolytic anemia, leukopenia, lymphopenia or thrombocytopenia), and the identification of positivity for antinuclear antibodies (ANA) (titer>1:100), or autoantibodies such as anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anticardiolipin, lupus anticoagulant and false positive VDRL. The SLEDAI (18) and SLICC damage index (19) were used to assess disease activity and cumulative damage in each patient.

VITAMIN D MEASUREMENTS

Blood samples were collected during each patient's medical appointment, between 4 and 6 p.m., after at least 4 hours of fasting. In order to limit the effects of seasonal variations in vitamin D photosynthesis, all patients were recruited and evaluated in the spring. All samples were frozen at -80°C and analyzed at the same time. Serum 25(OH)D levels were measured by chemiluminescence assay (LIAISON - DiaSorin Inc, Stillwater/MN, CV 6% intra-assay) according to the manufacturer's instructions; wherein values <20 ng/ml were considered to indicate vitamin D deficiency and levels \geq 20 ng/ml were considered normal.

CYTOKINE MEASUREMENTS

Serum cytokine concentration was determined by the flow cytometry of once-thawed serum using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) assay (BD Biosciences, San Diego, CA): The Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit was used to quantify the serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-17A, and Human Cytokine Flex Sets were used to measure IL-12/IL-23p40, IL21, IL-12p70 and IFN- α levels. Samples were processed and analyzed according to the manufacturer's instructions. Briefly, serum samples were incubated with cytokine capture beads and PE-conjugated detection antibodies at room temperature and protected from light. Samples were then washed, and data were acquired using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA). The standard curves were generated in

graphical and tabular format using the BD CBA Analysis Software FCAP Array™ 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA) with R² above 0.99 for all cytokines and the results were calculated using the five parameter logistic equation.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed using the SPSS 16.0 program for Windows, and descriptive statistics were expressed as mean, standard deviation, median and interquartile range (IQR). Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Between-group comparisons of cytokine levels and categorical variables were performed using the Mann-Whitney test. Spearman correlation coefficients were used to evaluate the association between continuous variables. A linear regression analysis was also performed to control for the effects of confounding factors (use of NSAIDs, prednisone, antimalarial drugs and immunosuppressants). Results were considered significant at $p < 0.05$, and correlations were considered clinically significant if they exceeded 0.5.

RESULTS

The final sample consisted of 172 patients diagnosed with SLE, most of whom were female ($n=161$; 94%) and of European-derived ($n=128$; 74.4%). Mean patient age was 40.5 ± 13.8 years, and mean age at diagnosis was 31.5 ± 13.4 years. The frequency of clinical and laboratory manifestations of SLE in the sample is displayed in Table 1. These data have been described in a previous publication by the same group of researchers (7). At the time of study enrollment, the mean SLEDAI score was 2 (IQR: 1-4), while the corresponding values for the SLICC were 0 (IQR: 0-1). On study entry, patients were taking: NSAIDs ($n=30$; 17.4%), analgesics ($n=58$; 33.7%), prednisone ($n=75$; 43.6%), antimalarials ($n=143$; 83.1%) and immunosuppressants ($n=82$; 47.7%) (Table 1).

Table I. Demographic, clinical, and laboratory features of SLE patients ^a.

Patients' features	n=172
Demographic profile	
Females	161 (93.6)
European-derived	128 (74.4)
Age (years) [†]	40.5 (\pm 13.8)
Age at diagnosis (years) [†]	31.5 (\pm 13.4)
Criteria for diagnostic classification	
Photosensitivity	136 (79.1)
Malar rash	105 (61.0)
Discoid rash	23 (13.4)
Oral ulcers	70 (40.7)
Arthritis	145 (84.3)
Serositis	49 (28.5)
Hematologic disorders	135 (78.5)
Hemolytic anemia	54 (31.4)
Leuko/Lymphopenia	112 (65.1)
Thrombocytopenia	44 (25.6)
Nephritis	82 (47.7)
Neurologic disorders	20 (11.6)
Convulsion	11 (6.4)
Psychoses	10 (5.8)
Immunologic disorders	129 (75)
Anti-dsDNA	98 (57)
Anti-Sm	30 (17.4)
Anticardiolipins IgG/IgM	53 (30.8)
Lupic Anticoagulant	19 (11)
False positive VDRL	13 (7.6)
FAN	170 (98.8)

Anti-Ro/SSA	75 (43.6)
Anti-La/SSB	25 (14.5)
Anti-RNP	52 (30.2)
Sjögren´s syndrome	11 (6.4)
Antiphospholipid syndrome	11 (6.4)
SLEDAI ²	2 (0-4)
SLICC ²	0 (0-1)
C3 ¹	109.75 (±30.6)
C4 ¹	17.15 (±8.7)
Anti-dsDNA	32 (18.6)
25(OH)D ¹	25.4 (±11.0)
Treatments	
NSAIDs	30 (17.4)
Analgesics	58 (33.7)
Steroids/ Prednisone	75 (43.6)
Chloroquine/hydroxychloroquine	143 (83.1)
Immunosuppressive	82 (47.7)
Azathioprine ¹	60 (73.2)
Metotrexate ¹	10 (12.2)
Mycophenolate Mofetil ¹	12 (14.6)

FAN (Factor Anti-nuclear); SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index); SLICC (systemic lupus international collaborating clinics); NSAIDs (Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs).

¹Data expressed as n = number of individuals (%).

¹Média (±Standard Deviation) ²Mediana (interquatile range).

The mean serum 25(OH)D concentration in the sample was 25.4±11.04 ng/ml. Fifty-nine (34.3%) patients had a vitamin D deficiency, while 113 (65.7%) had normal vitamin D levels. One hundred and eight (62.8%) participants took vitamin D supplements, and 36 (61%) of the patients with vitamin D deficiencies consumed at least 800 UI of the vitamin every day. Figure 1 displays the distribution of Th1 (IFN- γ , IFN- α , TNF- α , IL-2), Th2 (IL-10, IL-4, IL-6) and Th17 cytokines (IL-17A, IL-21), as well as of IL-12/IL-23p40 and IL-12p70. No significant associations were found

between cytokine levels and vitamin D concentration (Table 2). Additionally, no associations were found between the presence of, secondary antiphospholipid syndrome, secondary Sjogren's syndrome, SLEDAI, SLICC damage index, anti-dsDNA, C3 and C4.

Table 2. Cytokine profiles and vitamin D levels in SLE patients

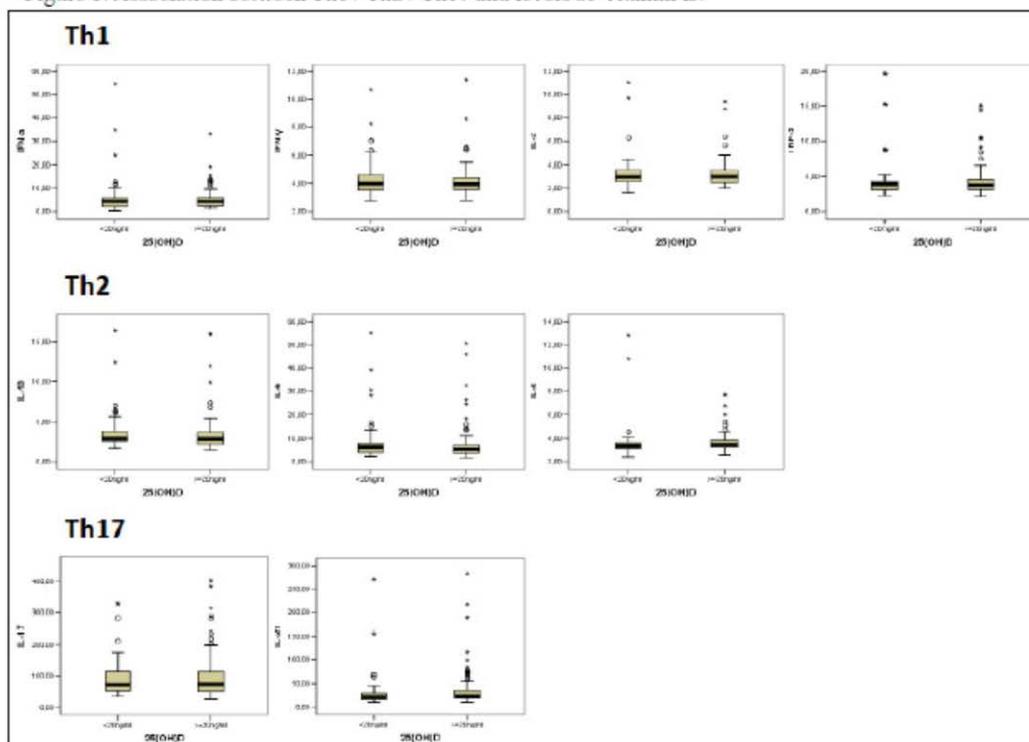
Cytokine profiles	25(OH)D <20 ng/ml n=59	25(OH)D ≥20 ng/ml n=113	p value ^a
Th1			
IL-2 ^b	2.98 (2.5-3.7)	3.00 (2.5-3.5)	0.98
IFN-γ ^b	3.97 (3.5-4.6)	3.95 (3.6-4.5)	0.97
IFN-α ^b	4.19 (2.2-5.6)	4.19 (2.5-5.6)	0.96
TNF-α ^b	3.89 (3.1-4.3)	3.77 (3.1-4.7)	0.66
Th2			
IL-10 ^b	2.93 (2.6- 3.9)	2.85 (2.1-3.7)	0.15
IL-6 ^b	6.33 (3.9-8,3)	5.30 (3.8-7.1)	0.22
IL-4 ^b	3.37 (3.2-3.7)	3.50 (3.3-3.8)	0.18
Th17			
IL-17 ^b	72.56 (53.4-112.7)	74.28 (52.5-112.2)	0.89
IL21 ^b	22.76 (16.7-30.5)	24.77 (20.7-36.2)	0.13
Other			
IL-12/IL-23p40 ^b	23.96 (15.9-38.5)	26.04 (14.7-41.2)	0.83
IL-12p70 ^b	1.81 (1.5-2.2)	1.87 (1.6-2.3)	0.51
SLEDAI ^b	2 (0-4)	2 (0-4)	0.79
SLICC ^b	0 (0-1)	0 (0-1)	0.23
C3 ^c	112.58 (±32.94)	108.27 (±29.41)	0.43
C4 ^c	16.18 (±7.93)	17.65 (±9.08)	0.43
Anti-dsDNA, n (%)	12 (20.34)	20 (17.7)	0.19

^aMann-Whitney test; ^bMedian (interquartile range); ^cMean (standard deviation)

The correlation between serum cytokine concentrations and clinical and laboratory manifestations of SLE are displayed in Table 3. Of the Th1 cytokines, TNF-α

and IFN- γ not showed statistically significant value, when correlated with clinical and laboratory variables. Moreover, INF- α showed a weak positive correlation with SLEDAI (r_s 0.219; $p=0.004$) and IL-2 shows weak negative correlation with VDRL (r_s -0.210; $p=0.006$). Th2 cytokine levels were not significantly correlated. The analysis of Th17 cytokines revealed no correlations between IL-17A levels and any clinical or laboratory variables. However, IL-21 showed weak negative correlation with hematological disorders (r_s -0.226; $p=0.003$). Cytokine IL-12p70 didn't show any correlation, and IL-12/IL-23p40 showed weak negative correlation with immune disorders (r_s -0.204; $p=0.007$).

Figure 1. Association between Th1 / Th2 / Th17 and levels of Vitamin D.



Graphical representation of the association between cytokine levels and normal and deficiency levels of vitamin D.

The Th1/Th2 ratio showed no significant differences in the prevalence of either profile. A linear regression analysis was performed to control for confounders in the correlations between cytokines and vitamin D, C3 and C4 levels, or the presence of anti-dsDNA, SLEDAI and SLICC damage index. However, this analysis produced no significant results (data not shown).

DISCUSSION

Although most of the sample used vitamin D supplements, approximately one third of participants had a vitamin D deficiency. Similar findings have been identified by several other studies. The first investigation to report low levels of vitamin D in patients with SLE was published in 1979 (20). Since then, several studies have confirmed that most patients with SLE have lower vitamin D levels than the general population (21). Studies performed in the same region as the present investigation have reported similar prevalence rates of vitamin D deficiency across different samples (22, 23). Vitamin D deficiency is a global health problem, and may occur regardless of vitamin D supplementation. This condition may cause several clinical problems, and is influenced by numerous factors which interfere with serum vitamin D levels, such as sun exposure, skin pigmentation, medication use and the presence of certain diseases.

In the present study, the prevalence of Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles did not differ between patients with and without a vitamin D deficiency. Vitamin D inhibits adaptive immune responses and may suppress the cytokines involved in the physiopathology of SLE, in the inhibition of dendritic cell maturation, Th1 activity, B cell maturation and differentiation and Treg cell function (24). SLE is associated with an imbalance between Th1, Th2 and Th17 cytokines, which may be modulated by vitamin D levels (10, 25, 26). However, this hypothesis was not confirmed by the present study.

An *in vitro* study of the intracellular cytokine phenotype of T-helper cells in patients with SLE showed Treg cell depletion and alterations in the balance of Th-cell subsets, with a particularly strong effect on IFN- γ levels (Th1 cytokine profile) (27). On the other hand, some studies have also found elevated Th1 and Th2 cytokines in patients with SLE as compared to controls (28). Alterations in T cell profiles consisting of increased IL-17A expression and decreased IFN- γ levels may be associated with the inflammatory process seen in SLE, especially in lupus nephritis (29). Other study has reported low serum IL-4 levels (Th2 cytokine profile) but increased IL-17 and IFN- γ expression in patients with SLE as compared to a control group. The IFN- γ levels were associated with pyuria and hematuria, while increased IL-17 levels were related to pyuria and proteinuria. Therefore, both these substances may serve as biomarkers of renal activity in SLE (30). The apoptosis and cytokine production triggered by high

Table 3. Correlation of serum cytokine with clinical and laboratory variable^a.

Clinical Features	INF-a	INF- γ	IL-2	TNF	IL-10	IL-6	IL-4	IL-17A	IL-21	IL-12p70	IL-12/ IL-23p40
Vitamin D	0.014	-0.036	-0.043	-0.013	-0.099	-0.088	0.071	-0.037	0.084	-0.008	0.036
Malar rash	-0.138	0.096	-0.015	-0.048	-0.055	-0.081	0.022	-0.053	-0.047	0.020	-0.040
Discoid rash	-0.041	-0.024	-0.013	-0.039	-0.021	0.042	0.097	-0.019	0.036	0.043	0.006
Photosensitivity	-0.069	0.172	-0.036	-0.052	0.084	0.070	-0.042	0.067	0.017	0.124	0.043
Oral ulcers	0.044	-0.090	0.066	-0.041	-0.016	0.115	-0.132	0.035	0.002	0.018	0.017
Arthritis	-0.143	0.110	-0.039	0.007	-0.165*	-0.111	0.095	-0.087	-0.005	-0.047	0.016
Serositis	0.019	0.139	0.033	0.028	-0.019	-0.180*	0.095	0.099	0.041	0.074	-0.004
Nephritis	-0.052	0.039	0.068	0.011	-0.130	0.010	0.096	-0.077	0.030	0.104	-0.069
Neurologic disorders	0.135	0.076	0.072	0.128	0.050	-0.106	-0.001	-0.013	0.177*	0.114	-0.044
Hematologic disorders	-0.149	-0.076	-0.009	-0.037	-0.175*	-0.017	-0.091	-0.060	-0.226**	-0.098	-0.076
Immunologic disorders	-0.052	-0.028	0.028	-0.018	-0.092	-0.129	0.079	-0.081	0.019	0.106	-0.204**
ANA	-0.031	0.030	0.053	0.072	0.054	0.003	0.033	0.028	0.001	-0.011	-0.014
VDRL (false positive)	-0.114	0.036	-0.210**	0.157*	-0.075	-0.124	-0.012	-0.049	-0.068	-0.138	-0.109
Sjögren's syndrome	0.021	-0.095	0.021	0.000	0.114	-0.020	-0.011	0.020	-0.081	-0.092	-0.057
Antiphospholipid syndrome	0.048	0.131	0.010	-0.032	0.007	-0.095	0.010	0.000	-0.012	-0.038	-0.070
SLEDAI	0.219**	0.139	0.029	-0.027	0.118	0.076	0.054	0.118	0.063	0.002	0.061
SLICC	0.063	-0.120	0.072	0.104	0.158*	0.157*	-0.015	0.141	-0.021	0.104	0.160*
C3	-0.138	-0.103	-0.017	-0.042	-0.085	0.106	-0.021	-0.150	0.036	-0.038	-0.103
C4	-0.147	-0.009	-0.062	-0.050	-0.142	0.042	0.037	-0.166*	0.029	-0.077	-0.032

^aData expressed as Spearman correlation (r_s). *Correlatin is significant at the 0.05 level; ** Correlatin is significant at the 0.01 level.

levels of proinflammatory cytokines may play a role not only in the early phases of the disease, but also in its progression over time.

An *in vivo* study of cytokines in mononuclear cells demonstrated that vitamin D supplementation had a beneficial effect on B and T cell homeostasis in patients with SLE, increasing the number of Treg cells and decreasing Th1 and Th17 responses. Vitamin D inhibits the activation of B cells and its differentiation in plasmocytes, decreasing the expression of immunoglobulins. Furthermore, vitamin D also appears to inhibit the activation and maturation of dendritic cells, which are the main producers of IFN (26). Another *in vivo* study performed in patients with SLE who received vitamin D supplementation confirmed the presence of decreased Th1 and Th17 responses in patients with this condition, as well as the increase in Treg cells, reduced memory B cells and decreased anti-dsDNA antibodies reported in similar samples by other studies (31). In the present study, serum cytokine levels were assessed in the absence of vitamin D supplementation, which may explain the lack of an association between vitamin D levels and cytokine profiles.

Vitamin D levels were not associated with clinical and laboratory manifestations of SLE, or with disease activity and damage indices. However, several studies have demonstrated the influence of vitamin D on the clinical and laboratory features of SLE, and low levels of this vitamin have been found to be associated with increased SLEDAI and SLICC damage index, greater fatigue indices and increased cardiovascular risk (32, 33). The association between vitamin D deficiency and disease activity was illustrated by a Brazilian study of 36 patients, which found lower 25(OH)D levels (mean: 17.4 ± 12.5 ng/mL) in patients with high disease activity (SLEDAI ≥ 12) than in those with lower activity indices (SLEDAI ≤ 3) or control individuals (34). However, published results on this topic remain controversial (21).

The analysis of the serum concentration of Th1, Th2 and Th17 cytokines, vitamin D levels and clinical and laboratory features of SLE revealed a weak positive correlation between IFN- α levels and SLEDAI, corroborating previous findings in the literature (35, 36). This cytokine stimulates the cytotoxic activity of CD8+ T lymphocytes. The increased expression of IFN-regulated genes in mononuclear peripheral blood cells, which is known as the "interferon signature", suggests a possible role of INF- α in the pathogenesis of SLE (37). However, the absence of correlations

between IFN- γ levels and disease activity reported by this and other studies suggests that this topic is still controversial (30, 38). The literature has also identified positive correlations between TNF- α levels and disease activity, which supports the use of this cytokine as a biomarker in SLE (39). However, this correlation was not found in the present study, and as well as no correlation with the Th2 cytokines, IL-17A and IL-12p70, and clinical and laboratory variables were found.

IL-2 was weakly and negatively correlated with false-positive VDRL results, and a similar correlation was found between IL-21 and hematological alterations. Additionally, IL-12/IL-23p40 was weakly and negatively correlated with immunological alterations. Since, at the time of writing, these associations have not been sufficiently explored in the literature, it is possible that they were obtained by chance.

The IFN- γ /IL-4 ratio reflects the Th1/Th2 ratio, since IFN- γ is predominantly expressed by Th1 cells, while IL-4 is produced by Th2 cells (40). Alterations in the expression of these cytokines result in changes to the IFN- γ /IL-4 ratio, reflecting changes in the Th1/Th2 cell ratio (41). The lack of statistically significant differences in the prevalence of Th1 and Th2 cells in the present study suggested the absence of an association between vitamin D deficiency and Th cell profiles.

The main limitation of the present study was the lack of a control group for the measurement of cytokine and vitamin D levels. Such a design would have allowed for a comparative analysis of cytokine profiles. Since the present study only involved the cross-sectional evaluation of serum cytokine levels, the absence of significant differences between patients with and without vitamin D deficiencies may be attributable to intersubject variability. The longitudinal evaluation of vitamin D levels may enhance the identification of associations between vitamin D levels and cytokine profiles by accounting for interindividual variation in the bioavailability of active vitamin D and quantity of active receptors. Associations between vitamin D supplementation and decreased SLE activity have also been reported in the literature (31-33, 42). However, the studies of this association did not investigate cytokine profiles.

This was the first study to evaluate the relationship between Th1, Th2 and Th17 cytokines and serum 25(OH)D levels in patients with SLE. Although our findings were nonsignificant, they make important contributions to future clinical and experimental studies by reinforcing need for longitudinal investigations of vitamin D levels. Such studies would allow for the assessment of the role of prolonged vitamin D deficiency, genetic polymorphisms in vitamin D receptors, intersubject variability and other as yet unknown factors on immunomodulation. Randomized clinical trials of the effects of vitamin D supplementation on immunological markers are still required before definitive conclusions can be drawn regarding the role of vitamin D in immunomodulation.

FUNDING

This study was supported by grants from the Research Incentive Fund (FIPE; Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

1. Uramoto KM, Michet CJ, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 1999;42(1):46-50.
2. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl).* 2010;88(5):441-50.
3. Norman AW. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(6):1108-10.

4. Qiao SW, Iversen R, Ráki M, Sollid LM. The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol.* 2012;34(4):523-40.
5. Arnsen Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(9):1137-42.
6. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(8):404-12.
7. Monticielo OA, Teixeira TeM, Chies JA, Brenol JC, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2012;31(10):1411-21.
8. Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, Plebani M, Shoenfeld Y, Wang TJ, et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev.* 2010;9(11):709-15.
9. Kamen DL, Aranow C. The link between vitamin D deficiency and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;10(4):273-80.
10. Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, Kamen DL, Macwana SR, Roberts VC, et al. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(9):1569-74.
11. Reiner SL. Development in motion: helper T cells at work. *Cell.* 2007;129(1):33-6.
12. Aranow C. Vitamin D and the immune system. *J Investig Med.* 2011;59(6):881-6.
13. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Garcia-Unzueta M, Amado JA, Cacho PM, Martinez-Taboada VM. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. *J Leukoc Biol.* 2012;91(5):829-38.
14. Aloy I, Towers TL, Freedman LP. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol.* 1995;15(10):5789-99.
15. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol.* 1985;134(5):3032-5.
16. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(1):23-33.
17. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
18. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630-40.
19. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39(3):363-9.
20. O'Regan S, Chesney RW, Hamstra A, Eisman JA, O'Gorman AM, Deluca HF. Reduced serum 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ levels in prednisone-treated adolescents with systemic lupus erythematosus. *Acta Paediatr Scand.* 1979;68(1):109-11.

21. Sahebari M, Nabavi N, Salehi M. Correlation between serum 25(OH)D values and lupus disease activity: an original article and a systematic review with meta-analysis focusing on serum VitD confounders. *Lupus*. 2014.
22. Premaor MO, Paludo P, Manica D, Paludo AP, Rossatto ER, Scalco R, et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. *J Endocrinol Invest*. 2008;31(11):991-5.
23. Scalco R, Premaor MO, Fröhlich PE, Furlanetto TW. High prevalence of hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in elders living in nonprofit homes in South Brazil. *Endocrine*. 2008;33(1):95-100.
24. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):26-34.
25. Yusupov E, Li-Ng M, Pollack S, Yeh JK, Mikhail M, Aloia JF. Vitamin d and serum cytokines in a randomized clinical trial. *Int J Endocrinol*. 2010;2010.
26. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol*. 2009;183(9):5458-67.
27. Dolff S, Bijl M, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG, Abdulahad WH. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2011;141(2):197-204.
28. Lit LC, Wong CK, Li EK, Tam LS, Lam CW, Lo YM. Elevated gene expression of Th1/Th2 associated transcription factors is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2007;34(1):89-96.
29. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, et al. Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol*. 2010;159(1):1-10.
30. Elewa EA, Zakaria O, Mohamed EI, Boghdadi G. The role of interleukins 4, 17 and interferon gamma as biomarkers in patients with Systemic Lupus Erythematosus and their correlation with disease activity. *The Egyptian Rheumatologist*. 2014;36(1):21-7.
31. Terrier B, Derian N, Schoindre Y, Chacara W, Geri G, Zahr N, et al. Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R221.
32. Amital H, Szekanecz Z, Szűcs G, Dankó K, Nagy E, Csépany T, et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):1155-7.
33. Petri M, Bello KJ, Fang H, Magder LS. Vitamin D in systemic lupus erythematosus: modest association with disease activity and the urine protein-to-creatinine ratio. *Arthritis Rheum*. 2013;65(7):1865-71.
34. Borba VZ, Vieira JG, Kasamatsu T, Radominski SC, Sato EI, Lazaretti-Castro M. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int*. 2009;20(3):427-33.
35. Dall'era MC, Cardarelli PM, Preston BT, Witte A, Davis JC. Type I interferon correlates with serological and clinical manifestations of SLE. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(12):1692-7.
36. Feng X, Wu H, Grossman JM, Hanvivadhanakul P, FitzGerald JD, Park GS, et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity

- and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006;54(9):2951-62.
37. Obermoser G, Pascual V. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010;19(9):1012-9.
 38. Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N. Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol.* 2008;181(3):2211-9.
 39. Postal M, Peliçari KO, Sinicato NA, Marini R, Costallat LT, Appenzeller S. Th1/Th2 cytokine profile in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Cytokine.* 2013;61(3):785-91.
 40. Qian Q, Li P, Wang T, Zhang J, Yu S, Chen T, et al. Alteration of Th1/Th2/Th17 cytokine profile and humoral immune responses associated with chromate exposure. *Occup Environ Med.* 2013;70(10):697-702.
 41. Tucci M, Lombardi L, Richards HB, Dammacco F, Silvestris F. Overexpression of interleukin-12 and T helper 1 predominance in lupus nephritis. *Clin Exp Immunol.* 2008;154(2):247-54.
 42. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial. *J Rheumatol.* 2013;40(3):265-72.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, os pacientes com e sem deficiência de vitamina D não apresentaram diferenças nos perfis de citocina Th1, Th2 e Th17. A vitamina D exerce uma ação inibitória sobre a resposta imune adaptativa por vários mecanismos, inclusive sobre as citocinas. No desenvolvimento do LES é visto um desequilíbrio entre as citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 que poderia ser modulado pelos diferentes níveis de vitamina D, o que não foi confirmado neste estudo.

Na análise de correlação entre as concentrações séricas das citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17, vitamina D e as variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES, evidenciamos fraca correlação positiva entre o IFN- α e o SLEDAI. Isso se deve aos pacientes com LES apresentarem uma maior expressão de genes regulados por IFN em células mononucleares do sangue periférico, o que é conhecido como “assinatura de interferon”, sugerindo um possível papel do IFN- α na patogênese do LES. O estudo foi realizado de forma transversal e é possível que a variabilidade entre os indivíduos do estudo possa ter contribuído para não termos encontrado diferenças significativas. Não avaliamos a suplementação de vitamina D de maneira longitudinal, o que poderia contribuir para que encontrássemos correlação entre níveis de vitamina D e o perfil de citocinas estudadas, pois os pacientes diferem entre si quanto à biodisponibilidade de vitamina D ativa e quantidade de receptores atuantes.

Apesar das limitações, este estudo é o primeiro a avaliar a associação do perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e níveis séricos de 25(OH)D em pacientes com LES. Apesar dos resultados não terem sido significativos, eles são importantes para estudos clínicos e experimentais futuros, uma vez que reforçamos a necessidade de estudos com avaliação longitudinal dos níveis de vitamina D, considerando a hipótese de que a imunomodulação possa estar relacionada com o tempo prolongado de deficiência de

vitamina D, alterações genéticas do receptor de vitamina D, variabilidade interindividual e outros fatores ainda não conhecidos. Ensaios clínicos randomizados com suplementação de vitamina D avaliando marcadores imunológicos são necessários para investigar melhor o papel da vitamina D na imunorregulação ou se a vitamina D seria somente um epifenômeno ou realmente alteraria a suscetibilidade, o curso e o prognóstico do LES.

9. ANEXOS

ANEXO I - Critérios de classificação do lúpus eritematoso sistêmico (66-68)

Critérios	Definição
1. Eritema malar	Eritema fixo, plano ou elevado, nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial
2. Eritema Discóide	Placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrização atrófica nas lesões antigas
3. Fotossensibilidade	Eritema cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico
4. Úlcera oral	Ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente não dolorosa, observada pelo médico
5. Artrite	Artrite não erosiva envolvendo 2 ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame
6. Serosite	(a) Pleurite– história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural <i>ou</i> (b) Pericardite – documentada por ECG, atrito ou evidência de derrame pericárdico
7. Alteração renal	(a) Proteinúria persistente >0,5 g por dia ou >3+ se não quantificada <i>ou</i> (b) Cilindros celulares: podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos
8. Alteração neurológica	(a) Convulsão – na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.: uremia, cetoacidose ou distúrbios hidroeletrólíticos) <i>ou</i> (b) Psicose– na ausência de drogas implicadas ou

	alterações metabólicas conhecidas (ex.: uremia, cetoacidose ou distúrbios hidroeletrólíticos)
9. Alteração hematológica	(a) Anemia hemolítica com reticulocitose <i>ou</i> (b) Leucopenia– <4000/mm ³ total em 2 ou mais ocasiões <i>ou</i> (c) Linfopenia– <1500/mm ³ em 2 ou mais ocasiões <i>ou</i> (d) Trombocitopenia– <100 000/mm ³ na ausência de drogas causadoras
10. Alteração imunológica	(a) Anti-dsDNA– anticorpo ao DNA nativo em títulos anormais <i>ou</i> (b) Anti-Sm– presença do anticorpo ao antígeno nuclear Sm <i>ou</i> (c) Achados positivos de anticorpos antifosfolípidos baseados em: (1) concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM; (2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando teste-padrão ou (3) VDRL falso positivo por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs
11. Anticorpo antinuclear (FAN)	Título anormal do FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de drogas sabidamente associadas ao lúpus induzido por drogas
Para fins de classificação de doença, o (a) paciente deve apresentar pelo menos 4 dos 11 critérios.	

ANEXO II – Protocolo de avaliação clínica e laboratorial de lúpus eritematoso sistêmico

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DO AMBULATÓRIO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Registro: _____ n° _____
 Sexo: F M Raça: Branca Não branca
 Data de nascimento: ___/___/___
 Profissão: _____ Estado civil: _____
 Naturalidade/Procedência: _____
 Endereço: _____
 Cidade: _____ CEP: _____ - _____
 Telefones: _____

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ___/___/___ DATA DO DIAGNÓSTICO: ___/___/___
 MANIFESTAÇÕES INICIAIS NO DIAGNÓSTICO: _____
 INÍCIO DO ACOMPANHAMENTO NO HCPA: ___/___/___
 ÓBITO: S N DATA: ___/___/___
 CAUSA: _____

CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO PARA LES (ACR 1997)

1. Eritema malar 2. Eritema discóide 3. Fotossensibilidade 4. Úlceras orais/nasais
 5. Artrite 6. Serosite: Pleurite Pericardite
 7. Doença renal: Classe: _____ (data: ___/___/___) sem biópsia
 Índice de atividade ___/___ Índice de cronicidade: ___/___
 8. Doença neurológica: Psicose Convulsão
 9. Hematológico: Anemia hemolítica Leucopenia / linfopenia Plaquetopenia
 10. FAN: Titulação: _____ Padrão: _____
 11. Imunológico: anti DNA (Titulação: _____) anti Sm
 aCL: IgG: _____ IgM: _____
 Anticoagulante Lúpico VDRL

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS

Hipertensão	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Tabagismo	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> Atual	<input type="checkbox"/> Passado	Anos-maço: _____
Diabetes	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Etilismo	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> Atual	<input type="checkbox"/> Passado	
Dislipidemia	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Obesidade	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Peso: _____	Altura: _____	IMC: _____
Hist. Fam. DCV	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	SAAF	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Assinalar critérios na folha anexa		
Hist. Fam. LES	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	S. de Sjögren	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Assinalar critérios na folha anexa		
Eventos CV	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> AVC <input type="checkbox"/> AIT <input type="checkbox"/> Angina <input type="checkbox"/> IAM <input type="checkbox"/> TVP <input type="checkbox"/> Claudicação intermitente <input type="checkbox"/> Outros: _____					

História obstétrica: G: ___/P: ___/C: ___/A: ___ obs.: _____

DAIs/Sobreposições: _____

Anti- ENA: _____

TRATAMENTO REALIZADO

- Corticoterapia (Dose Max: _____ mg/kg/d) Pulsoterapia Ciclofosfamida
 Azatioprina Cloroquina / Hidroxicloroquina Metotrexate
 Micofenolato mofetil Dapsona Ciclosporina
 Rituximabe AAS Anticoagulante
 ACO/TRH CaCo3/D3 Bisfosfonados
 Estatina Danazol Anti-hipertensivos

ANEXO III – Ficha de avaliação para dosagem da vitamina D**FICHA DE AVALIAÇÃO PARA DOSAGEM DE VITAMINA D**

IDENTIFICAÇÃO (data da coleta: ____/____/____)

PESQUISADOR: _____

NOME: _____ Nº _____

REGISTRO: _____

SEXO: F M

FOTOTIPO: _____

IDADE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

DATA DO DIAGNÓSTICO: ____/____/____

SLEDAI: _____ - DATA: ____/____/____

SLICC: _____ - DATA: ____/____/____

PESO: _____ ALTURA: _____ IMC: _____

CICLO MENSTRUAL: _____

TABAGISMO: _____

ALCOOLISMO: _____

INGESTA DIETÉTICA DE CÁLCIO: _____

CARBONATO DE CÁLCIO (DOSE E DURAÇÃO): _____

VITAMINA D (DOSE E DURAÇÃO): _____

DOSE ATUAL DE CORTICÓIDE: _____

DOSE MÉDIA DE CORTICÓIDE NO ÚLTIMO ANO: _____

ANEXO IV– Protocolo Citometria de Fluxo – Cytometric Beads Array-CBA

1. Preparo do mistura das *beads* de captura

Esta etapa leva cerca de 30 minutos (quando a amostra for soro ou plasma).

Objetivo: preparar um *pool* das sete citocinas (imediatamente antes do uso).

A) Determine o número de amostras (incluindo os padrões e controles)

Ex: 86 amostras + 10 padrões = 96 tubos

B) Dar *vortex* vigoroso em cada tubo de *beads* (3 a 5s)

C) Cálculo: kit instrui adicionar 10ul de cada *bead* por amostra. Considerar

10% de erro de pipetagem e otimização da técnica (rendimento de 2x).

Ex: $(106 \times 10)/2 = 530 \mu\text{l}$. Assim, adicionar 530 μl de cada *bead* para o tubo de mistura.

D) Homogeneizar bem a mistura.

E) Se a amostra for soro ou plasma: ressuspender as *beads* no *Serum Enhancement Buffer*:

- centrifugar a mistura de *beads* a 300g (força centrífuga) por 10 minutos
- aspirar e descartar cuidadosamente o sobrenadante
- ressuspender o *pellet* em *Serum E. Buffer* (2.650 μl porque vamos pipetar 25 μl da mistura por amostra. Dar *vortex*.
- incubar a mistura de *beads* por 30 minutos, a temperatura ambiente, protegido da luz.

2. Preparo dos padrões de citocinas

Esta etapa leva cerca de 15 minutos. Os padrões devem ser preparados para cada experimento, não sendo recomendado armazenar ou reutilizar padrões já reconstituídos.

A) Abra um *vial* de padrão liofilizado, transfira as esferas para um tubo de 15ml e reconstitua com 2 ml do *Assay Diluent*

B) Deixe o tubo por no mínimo 15 minutos a temperatura ambiente (para equilibrar o padrão reconstituído)

C) Homogeneizar com cuidado (com a pipeta, sem *vortex*). Este é o tubo *Top Standard*

D) Prepare 8 tubos para a diluição seriada: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256.

E) Pipete 300 µl do *Assay diluent* em cada tubo.

F) Faça a diluição seriada: transfira 300 µl do *Top Standard* para o tubo 1:2, misture (sem *vortex*) e siga a diluição.

G) Prepara um tubo só com *Assay Diluent* – Branco (controle negativo).

Concentração (pg/ml)	Diluição do padrão de citocinas
0	Sem diluir (só diluente)
20	1:256
40	1:128
80	1:64
156	1:32
312,5	1:16
625	1:8
1250	1:4
2500	1:2
5000	<i>Top standard</i>

3. Incubação das amostras

A) Fazer o espelho da placa.

- B) Em uma placa de fundo redondo, pipetar 30 μ l das amostras e 30 μ l da curva.
- C) Pipetar 25 μ l da mistura de *beads* em todos os poços.
- D) Incubar por 1,5h protegido da luz, a temperatura ambiente.
- E) Adicionar 100 μ l de *wash buffer* e centrifugar 300g por 10 minutos.
- F) Desprezar o sobrenadante (invertendo a placa sobre a pia).
- G) Adicionar 25 μ l do *Detection Reagent PE*.
- H) Incubar por 1,5h protegido da luz, a temperatura ambiente. OBS: durante esta incubação, realizar a calibração e setagem.
- I) Adicionar 100 μ l de *wash buffer* e centrifugar 300g por 10 minutos.
- J) Desprezar o sobrenadante (invertendo a placa sobre a pia).
- K) Adicionar 150 μ l, ressuspender o *pellet* e iniciar aquisição dos dados.

4. Setagem do equipamento: passar as *beads* de setagem.

Esta etapa leva cerca de 30 minutos.

- A) Calibrar o equipamento com o *Calibrite* (em *lyse/no wash*).
- B) Preparo das *beads* de setagem:
- Adicionar 50 μ l das *beads* de setagem em três tubos: A, B e C.
 - No tubo B, adicionar 50 μ l do Controle Positivo para FITC.
 - No tubo C, adicionar 50 μ l do Controle Positivo para PE.
 - Incubar os tubos a temperatura ambiente por 30 minutos, protegido da luz.
 - Adicionar 450 μ l de *wash buffer* no tubo A e 400 μ l nos tubos B e C.
- C) Abrir o *template* de compensação.

C) No *FCAP*:

I. Abrir programa, colocar senha (BDIS).

II. Escolher *New Experiment*.

III. Em *Overview*, colocar *Next*.

IV. Em *Test samples*, número de amostras = 0.

V. Em *Plex Components*: escolher as beads que foram utilizadas na dosagem (verifique bead ID na identificação do reagente).

VI. Em *Clustering Parameters*: selecionar arquivo de um ponto da curva, definir o nome do equipamento (FACSCalibur), *Scatter parameter* = SSC, *Number of scatter peaks* = 1, *Clustering parameters* = FL3, *Reporter parameter* = FL2.

VII. Em *Analyte Assignment*: associar os clusters às *beads* (selecionar o cluster na esquerda e dar dois cliques no pico correspondente na direita). Ex de ordem dos picos, da esquerda para a direita: *bead C*, *bead B*, *bead A*.

VIII. Na próxima aba, em *Fitting Equation*, selecionar 5 parâmetros logísticos.

IX. Em *Standards*: definir unidade e valores de concentração dos pontos da curva (verificar na *datasheet* do kit ou Flex).

X. Na próxima aba, número de controles = 0.

XI. Dar *Next* até aba que aparece Nome do Experimento. *Finish* e salvar em uma pasta.

XII. Em *File Assignment*, correlacionar os pontos da curva com os arquivos da curva.

XIII. *Start analyzing this experiment*. Após, o programa mostra se houve algum erro. Se der erro, analisar as curvas, os dados brutos e tentar “melhorar” a curva (Ex: excluindo algum dos pontos).

XIV. Quando tudo Ok, salvar o *Report* em PDF e imprimir (os valores de A, B, C, D e E para cada bead serão utilizados no cálculo).

C) No *FCAP*:

I. Abrir programa, colocar senha (BDIS).

II. Escolher *New Experiment*.

III. Em *Overview*, colocar *Next*.

IV. Em *Test samples*, número de amostras = 0.

V. Em *Plex Components*: escolher as beads que foram utilizadas na dosagem (verifique bead ID na identificação do reagente).

VI. Em *Clustering Parameters*: selecionar arquivo de um ponto da curva, definir o nome do equipamento (FACSCalibur), *Scatter parameter* = SSC, *Number of scatter peaks* = 1, *Clustering parameters* = FL3, *Reporter parameter* = FL2.

VII. Em *Analyte Assignment*: associar os clusters às *beads* (selecionar o cluster na esquerda e dar dois cliques no pico correspondente na direita). Ex de ordem dos picos, da esquerda para a direita: *bead C*, *bead B*, *bead A*.

VIII. Na próxima aba, em *Fitting Equation*, selecionar 5 parâmetros logísticos.

IX. Em *Standards*: definir unidade e valores de concentração dos pontos da curva (verificar na *datasheet* do kit ou Flex).

X. Na próxima aba, número de controles = 0.

XI. Dar *Next* até aba que aparece Nome do Experimento. *Finish* e salvar em uma pasta.

XII. Em *File Assignment*, correlacionar os pontos da curva com os arquivos da curva.

XIII. *Start analyzing this experiment*. Após, o programa mostra se houve algum erro. Se der erro, analisar as curvas, os dados brutos e tentar “melhorar” a curva (Ex: excluindo algum dos pontos).

XIV. Quando tudo Ok, salvar o *Report* em PDF e imprimir (os valores de A, B, C, D e E para cada bead serão utilizados no cálculo).

D) No citômetro, abrir arquivo *CBA para refazer stats* (no desktop), abrir os arquivos das amostras (somente R1) e ajeitar os *gates* das citocinas analisadas.

E) Exportar os valores de MFI fazendo *batch*:

I. Selecionar tabelas das estatísticas – *Export Statistics* (em *File*). Criar uma pasta para os *Stats*.

II. Fazer *Batch Setup* a partir da primeira amostra da pasta; escolher entre 3-5 s ou fazer manualmente; em *Existing Files*, colocar *Append* e selecionar a pasta dos *Stats*.

III. Fazer *Batch Run* e acompanhar para ver se todas as amostras permanecem nos *gates*.

F) Copiar arquivo *Jonier* e arquivo *Stats* com os valores de MFI.

G) No Excel, copiar os números/fórmulas do arquivo *Jonier*. Fazer uma planilha para cada citocina, substituindo os valores de A, B, C, D e E de *Jonier* por aqueles do *Report* obtido no FCAP, colocar os MFI das amostras e puxar a fórmula. (OBS: conferir a ordem dos *gates* utilizada para exportar valores de MFI para identificar corretamente o que cada *gate* (Ex: R1, R2 e R3, ou seja, G1, G2 e G3) significa (Ex: IL-6, IL-10 e TNF).

ANEXO V – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DA VITAMINA D EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Os portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) apresentam fatores hormonais implicados no seu surgimento e evolução. Este estudo está sendo realizado para tentar identificar possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de LES e existência de correlação com as manifestações clínicas.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Mediante consentimento do paciente, será coletada uma amostra de 10 ml sangue que será destinada à dosagem dos níveis de vitamina D.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS DA PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

1. Avaliar a influência da vitamina D nos pacientes com LES.
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a LES.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma)

HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em dezembro de 2010 e para avaliar a influência da vitamina D nos pacientes com LES. No entanto, é possível que outros fatores relacionados ao surgimento do LES possam ser analisados futuramente. Para tal, o paciente, através de um novo contato com a equipe pesquisadora, deverá autorizar novamente o uso da amostra já coletada e o novo projeto deverá ser avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa da instituição e Conselho Nacional de Ética em

Pesquisa. Outra possibilidade é a de um novo contato com o paciente em 5 ou 10 anos para verificar a evolução da doença.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, permito que os dados desta pesquisa sejam utilizados para análise da influência da vitamina D em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 20__.

Pesquisadores responsáveis:

Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol: Telefone: (051) 2101 8340; FAX: (051) 3331 3834

Odirlei André Monticielo: Telefone: (051) 9652 6170

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde: Telefone: (051) 2101 8304