

Carla Bastos Valeri

Avaliação da vasculatura pulmonar na esclerose
sistêmica

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

Programa de Pneumologia

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Valente
Barbas

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Valeri, Carla Bastos

Avaliação da vasculatura pulmonar na esclerose sistêmica / Carla Bastos
Valeri. -- São Paulo, 2011.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pneumologia.

Orientadora: Carmen Sílvia Valente Barbas

Descritores: 1.Escleroderma sistêmico 2.Escleroderma difusa 3.Circulação
pulmonar 4.Arteria pulmonar 5.Microscopia confocal a laser 6.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-202/11

Carla Bastos Valeri

Avaliação da vasculatura pulmonar na esclerose
sistêmica

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

Programa de Pneumologia

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia
Valente Barbas

São Paulo
2011

Dedicatórias

Dedico esta tese de doutorado a:

Meus filhos Rafael e Alice e ao meu marido Luciano:
meu amor por vocês me certifica da existência de Deus

Minha mãe Carmélia (linda):
otimismo e exemplo de mãe

Meu pai Severino (*in memorian*):
pai maravilhoso, quanta saudade...

Minhas irmãs Paula e Débora:
irmãs e amigas, vocês me orgulham muito

Agradecimentos

Agradeço:

Em primeiro lugar a Deus por me cercar de pessoas maravilhosas e permitir que eu realize todos os meus sonhos.

À Professora Carmen Silvia Valente Barbas, pessoa íntegra e bondosa, além de excelente orientadora, sempre presente e disposta a ajudar.

Ao Dr. Alexandre Ab'Saber que me ajudou muito com o preparo e leitura das lâminas.

À Professora Vera Capelozzi pela ajuda e gentileza em ceder seu laboratório para análise das lâminas.

À Ana Lucia Garippo pelo auxílio com o confocal e pelas palavras doces.

Ao Dr. Edwin Parra, Dra Walcy Teodoro e Ângela pela ajuda com as lâminas.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

“Nossos sonhos realizam-se à medida que avançamos num veículo feito de persistência, com motor movido a coragem e com a força de vontade rodando no lugar dos pneus.”

Michele Bertolletti

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO

1.1.	Esclerose Sistêmica: Definição e História	02
1.2.	Epidemiologia	03
1.3.	Classificação	04
1.4.	Diagnóstico	07
1.5.	Autoanticorpos	08
1.6.	Manifestações Clínicas	09
1.7.	Esclerose Sistêmica e Pulmão	16
1.8.	Doença Intersticial	17
1.9.	Doença Vascular	20
1.10.	Patologia Vascular e Esclerose Sistêmica	23

2.	HIPÓTESE	26
----	----------------	----

3. OBJETIVO	28
4. MÉTODOS	30
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6. RESULTADOS	43
7. DISCUSSÃO	
7.1. Análise da microscopia confocal das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre na Esclerose Sistêmica	65
7.2. Análise imunohistoquímica da expressão de I-CAM e V-CAM das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre na Esclerose Sistêmica	67
7.3. Estudo prévio dos vasos na Esclerose Sistêmica ..	70
7.4. Esclerose Sistêmica e Hipertensão Arterial Pulmonar	72
7.5. Estudos realizados na Faculdade de Medicina da USP	73
7.6. Considerações sobre o estudo atual	74
8. CONCLUSÃO	76
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

Abreviaturas

μm : micrômetro

$\text{m}\mu^2$: micrômetro ao quadrado

mmHg : milímetro de mercúrio

mM : milimolar

nM : nanomolar

Siglas

AL: área do lúmen

AL/ATV: divisão da área do lúmen pela área total do vaso

Anti Scl-70: anticorpo anti-esclero 70

Anti ThRNP: anticorpo anti-ribonucleoproteína Th

Anti RNA polimerase: anticorpo anti polimerase ácido ribonucléico

ARA: Associação Americana de Reumatologia

ATV: área total do vaso

ATV – AL: subtração da área do lúmen da área total do vaso

CD34: antígeno marcador de endotélio

CPT: capacidade pulmonar total

CVF: capacidade vital forçada

DLCO: capacidade de difusão do monóxido de carbono

ES: Esclerose Sistêmica

EUA: Estados Unidos da América

FITC: isômero de isocianato de fluoresceína

HAP: hipertensão arterial pulmonar

ICAM: molécula de adesão intercelular

IECA: inibidores da enzima de conversão da angiotensina

IL-4: interleucina 4

MHC: molécula de histocompatibilidade

NO: óxido nítrico

NSIP: pneumonia intersticial não específica

NT-pro BNP: peptídeo natriurético cerebral N terminal

ROS: espécies reativas de oxigênio

UIP: pneumonia intersticial usual

VCAM: molécula de adesão da célula vascular

Lista de Tabelas

Tabela 1A e 1B. Áreas das artérias do grupo ES	45 e 46
Tabela 2. Áreas das artérias do grupo Controle	47
Tabela 3A e 3B. Dados da ATV - AL e AL/ATV x 100 do grupo ES	48 e 49
Tabela 4. Dados da ATV - AL e AL/ATV x 100 do grupo Controle	50
Tabela 5. Média, desvio-padrão, valor mínimo e máximo das áreas e relações da ES e grupo Controle	51
Tabela 6. Informações das pacientes cujas biópsias foram analisadas	52
Tabela 7. Resultado das contagens da expressão de ICAM nos vasos do grupo ES	55
Tabela 8. Resultado das contagens da expressão de ICAM nos vasos do grupo controle	57
Tabela 9. Resultado das contagens da expressão de VCAM nos vasos do grupo ES	59
Tabela 10. Resultado das contagens da expressão de VCAM nos vasos do grupo controle	62

Lista de Figuras e Gráficos

Figura 1. Sistema de microscopia confocal a laser	32
Figura 2. Foto da artéria do grupo ES vista através do microscópio confocal a laser	33
Figura 3. Foto da artéria do grupo Controle vista através do microscópio confocal a laser	34
Figura 4. Foto da imunohistoquímica – ICAM-1 do grupo ES	37
Figura 5. Foto (2) da imunohistoquímica – ICAM-1 do grupo ES	37
Figura 6. Foto da imunohistoquímica – VCAM-1 do grupo ES	38
Figura 7. Foto (2) da imunohistoquímica – VCAM-1 do grupo ES	38
Figura 8. Foto da imunohistoquímica – ICAM-1 do grupo controle	39
Gráfico 1. Área Total do Vaso dos grupos ES e Controle	53
Gráfico 2. Área do Lúmen dos grupos ES e Controle	53
Gráfico 3. ATV - AL dos grupos ES e Controle	54
Gráfico 4. AL/ATV x 100 dos grupos ES e Controle	54

Resumo

Valeri, CB. Avaliação da Vasculatura Pulmonar na Esclerose Sistêmica. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

A lesão pulmonar é a principal causa de morte da Esclerose Sistêmica (ES), e as alterações principais são: o acometimento intersticial e o vascular. No presente estudo analisamos através do microscópio confocal a laser 40 artérias pulmonares de pequeno e médio calibre de pacientes com ES e 16 controles. Medimos a área do lúmen, a área total do vaso e fizemos a subtração da área total do vaso menos a do lúmen, e a porcentagem da área do lúmen em relação à área total do vaso. Observou-se que a área do lúmen e a porcentagem da área do lúmen em relação a área total do vaso são significativamente menores na ES em relação ao controle, e que a diferença entre a área total do vaso e a área do lúmen foi maior no grupo ES. Os achados confirmaram a hipótese inicial de acometimento das artérias pulmonares na ES, que se encontram espessadas devido à inflamação, infiltração celular em suas camadas e ativação endotelial.

Descritores: Escleroderma Sistêmico, Esclerodermia Difusa, Circulação Pulmonar, Artéria Pulmonar, Microscopia Confocal a Laser, Imunoistoquímica.

Summary

Valeri, CB. Evaluation of Pulmonary Vasculature in Systemic Sclerosis. [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011.

Lung injury is the leading cause of death in Systemic Sclerosis (SSc), and the main changes are: the vascular and interstitial involvement. In this study we analyzed through the confocal laser microscope 40 lung arteries of small and medium-sized of patients with SSc and 16 arteries of control group. We measured the lumen area, the total vessel area, made the subtracting the total vessel area minus the lumen area and the percentage between the lumen area and total vessel area. It was observed that the lumen area and the percentage between the lumen area and total vessel area were significantly lower in SSc group compared to control group, and the difference between the total vessel and the lumen area was higher in SSc. The findings confirmed the initial hypothesis of pulmonary arterial injury in SSc, wich are thickened due to inflammation, cellular infiltration into its layers and endothelial activation.

Descriptors: Scleroderma Systemic, Scleroderma Diffuse, Pulmonary Circulation, Pulmonary Artery, Confocal Laser Microscope, Immunohistochemistry.

1. INTRODUÇÃO

ESCLEROSE SISTÊMICA

1.1 Definição e História

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença crônica autoimune do tecido conectivo, com lesão e fibrose da pele e de órgãos internos (1), e altamente heterogênea em sua apresentação clínica, quantidade e severidade dos órgãos alvos envolvidos, alterações imunológicas, evolução e morbi-mortalidade (2).

A primeira descrição de uma doença semelhante à esclerodermia foi feita por Curzio em Nápoles em 1753, quando uma mulher jovem apresentou endurecimento excessivo da pele. Em 1847 Gintrac cunhou o termo escleroderma, pois a pele era visivelmente o órgão mais acometido com intensa fibrose. Apenas em 1889 Finlay descreveu o envolvimento de órgãos internos devido a um caso de esclerodermia com lesão pulmonar. E foi em 1903 que Ehrmann relatou doença esofágica. Em 1945 Goetz passou a chamar a doença de “esclerose sistêmica progressiva”. Em 1964 Winterbauer descreve a síndrome de CREST e em 1968 Gerald Rodnan criou um método para quantificar a gravidade e a extensão das lesões cutâneas, sendo até hoje uma ferramenta importante no seguimento da evolução da doença (3).

1.2 Epidemiologia

A raridade da doença bem como sua intensa heterogeneidade clínica, dificulta a realização de estudos epidemiológicos.

Estima-se que a prevalência da ES seja de 3 a 24 casos por 100.000, sendo mais elevada nos Estados Unidos e Austrália em comparação com a Europa e Japão (4), e a incidência varia de 2,6-13,9 casos novos/1.000.000 habitantes/ano (5). O gênero feminino é mais afetado, sendo a média da relação de prevalência de 3 mulheres para cada homem. Esse valor torna-se maior dependendo da faixa etária e do local, por exemplo, na Grã-Bretanha é de 6:1 e nos Estados Unidos de 8:1 (6), e de 7:1 durante o período de adulto jovem, voltando a ser de 2 a 3:1 durante a quinta década de vida (7).

O início dos sintomas geralmente ocorre entre os 40 e 50 anos de idade, porém nas mulheres pode ocorrer mais cedo, dos 30 aos 39 anos (8). Menos de 10% dos pacientes desenvolvem a doença antes dos 20 anos (9).

Alguns trabalhos tentaram avaliar a associação entre fatores de risco ambiental e ocupacional e o desenvolvimento da ES, no entanto, como a exposição é prolongada e sem método de mensuração quantitativa, torna-se praticamente impossível confirmar a relação causa-efeito. Os fatores de risco podem ser de natureza ocupacional como a sílica e solventes orgânicos, ou infecciosos como os vírus e bactérias e outros como drogas e pesticidas (10).

1.3 Classificação

A esclerodermia compreende um grupo heterogêneo de distúrbios que apresentam em comum o espessamento e esclerose da pele (11).

Apesar da lesão de pele em comum, fez-se necessária uma classificação dos distúrbios esclerodérmicos devido à intensa diferença dos órgãos acometidos, evolução, prognóstico e tratamento (12).

A esclerodermia é dividida inicialmente em dois grupos: a forma localizada e a sistêmica, na qual há lesão de órgãos internos.

Esclerodermia Localizada

Este grupo compreende as formas: linear, golpe de sabre e morfea localizada e generalizada (13).

- Esclerodermia linear: mais comum na infância, causando espessamento da pele e subcutâneo no trajeto de um dermatômetro (14).
- Esclerodermia golpe de sabre: um subtipo da linear e recebeu esse nome devido ao aspecto da lesão dermatológica (15).
- Morfea: dividida em forma localizada e generalizada, em ambas a pele esclerótica surge em regiões do tronco e dos membros onde antes havia pele normal. O que difere as duas formas é a extensão das lesões dermatológicas, na localizada são pequenas placas isoladas de pele esclerótica, e na generalizada os focos de pele

alterada estão espalhados por todo o corpo, o que pode mimetizar a ES. A morfea generalizada poupa as mãos e face e não causa danos em vasos e órgãos internos como a ES, mas por lesar tanto a pele algumas vezes faz-se necessário o uso de imunossupressores e drogas antifibróticas (16).

Esclerose Sistêmica

Classifica-se como ES quando coexistem a esclerose extensa da pele e o acometimento de órgãos internos (17).

Os subtipos de ES são:

- ES difusa
- ES limitada
- ES sem escleroderma: forma rara, caracterizada por vasculopatia e fibrose de órgãos internos sem endurecimento da pele (18,19)
- ES ambiental: esclerodermia difusa após exposição a agentes agressores ambientais como solventes orgânicos, pesticidas e resinas epóxi.
- Overlap syndrome: quando a ES coexiste com outras doenças reumatológicas tais como o lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite ou artrite reumatóide.

As formas mais comuns são a difusa e a limitada, que são diferenciadas pela extensão da esclerose da pele e pelo tipo de lesão dos órgãos alvo.

Na ES limitada a esclerodermia está restrita às mãos, face e região cervical, além de estar associada à síndrome de **CREST**, nome este decorrente das iniciais de: **C**alcinose da pele, fenômeno de **R**aynaud, **E**sôfago com dismotilidade, **eS**clerodactilia, e **T**elangiectasias. Outra alteração característica é a intensa anormalidade da capilaroscopia ungueal (15,20).

Faz-se o diagnóstico da forma difusa através da extensa esclerose da pele, acometendo as porções proximais dos membros bem como ombros, abdome, tronco, e geralmente poupando o dorso. Neste tipo observa-se também uma incidência maior de lesão grave de órgãos como o rim, coração e pulmão, o que piora o prognóstico (21).

1.4 Diagnóstico

A associação americana de reumatologia (ARA) em 1980 estabeleceu critérios diagnósticos que são usados até hoje:

Critério Maior

1. Esclerose da pele proximal às articulações metacarpofalangeanas e/ou metatarsofalangeanas.

Critérios Menores

1. Esclerodactilia: esclerose cutânea distal às articulações metacarpofalangeanas e/ou metatarsofalangeanas.
2. Perda de tecido ou cicatrizes escavadas nas pontas dos dedos.
3. Fibrose pulmonar bibasal.

O diagnóstico de ES é firmado pela presença de um critério maior ou de dois menores, sendo a sensibilidade destes critérios diagnósticos de 97% e a especificidade de 98% (17).

Em 1986 Fitzgerald e cols sugeriram a inclusão de mais um critério menor que é a capilaroscopia ungueal com alterações típicas da doença, aumentando deste modo a sensibilidade do diagnóstico para as formas limitadas e precoces da ES (22).

Em seguida Lonzetti e cols comprovaram o valor deste novo critério, e incluíram mais um para o diagnóstico de ES limitada que é a presença do anticorpo anticentrômero (15).

1.5 AutoAnticorpos

Os anticorpos antinucleares (ANA) estão presentes em cerca de 90% dos pacientes com ES. Dentre os anticorpos específicos da doença o anti-topoisomerase I (anti Scl-70) é encontrado em 20 a 40% dos casos, com maior frequência (82%) na forma cutânea difusa e nos acometimentos pulmonares intersticiais (17,20). O outro anticorpo é o anti-centrômero, diagnosticado em 70 a 80% dos pacientes, sendo que apenas 1% dos portadores tem a forma cutânea difusa. É raro, mas alguns pacientes podem ter os dois autoanticorpos positivos.

Outros autoanticorpos são: o anti-U3RNP (anti-fibrilarina), anti-ThRNP e anti-RNA polimerase I e III. O anti-U3RNP é mais freqüente nos pacientes não caucasianos, e não se correlaciona com nenhuma forma da doença. Os anticorpos anti-ThRNP são os mais raros dos três descritos. Os anti-RNA polimerase são mais comuns na forma cutânea difusa (19).

1.6 Manifestações Clínicas

CUTÂNEA

A alteração típica e que origina o nome da doença é o endurecimento da pele, variando bastante em relação a extensão e a intensidade. A face, as mãos e os dedos geralmente são os primeiros locais atingidos.

O escore de Rodnan modificado, bastante usado em ensaios clínicos, avalia 17 áreas do corpo e o grau de envolvimento da pele, sendo 0 (zero) atribuído ao normal e 3 (três) à lesão mais intensa (23).

Além da esclerose da pele pode ocorrer: edema e prurido nas fases iniciais, úlceras digitais, telangiectasias, calcinose e perda de subcutâneo das pontas dos dedos.

OSTEOARTICULAR

A artralgia com edema das mãos é um sintoma precoce da ES, principalmente na forma cutânea difusa. Outras alterações quase que exclusivas da forma difusa são: o atrito tendíneo e a síndrome do túnel do carpo. Alguns autores sugerem o atrito tendíneo como marcador de doença grave ou de lesão de órgão interno.

A verdadeira artrite inflamatória é rara na ES. As contraturas dos dedos são devido à fibrose em torno dos tendões e estruturas periarticulares. Se houver destruição articular deve-se investigar a associação com artrite reumatóide (*overlap syndrome*).

VASCULAR

- Fenômeno de Raynaud

A alteração vascular mais comum e típica da ES, devido a um espasmo das artérias de pequeno e médio calibre, desencadeado por frio ou stress. Os vasos mais atingidos são os digitais, mas o evento pode ocorrer também nos pododáctilos, língua, orelhas e nariz. A vasoconstrição causa mudança na coloração da pele, que fica pálida (branco), após cianótica (azul) e por último com hiperemia (vermelho) por causa da reperfusão (24). Esse fenômeno é reversível, no entanto, após inúmeros episódios, há uma tendência a mudanças estruturais nos vasos de pequeno calibre diminuindo permanentemente o fluxo sanguíneo das mãos, causando ulceração e infarto digital em 25 a 39% dos casos (25). Nos pacientes com doença cutânea limitada o fenômeno de Raynaud geralmente precede por anos os outros sintomas da doença, diferente da forma cutânea difusa, em que o fenômeno aparece concomitante ou até após as alterações de pele e osteoarticulares (26).

- Alteração de capilares ungueais

Apesar de afetar vasos de grande calibre, a vasculopatia da ES é predominantemente da microcirculação, isto é, capilares e arteríolas (27).

A capilaroscopia ungueal é um exame muito usado para diferenciar a ES e outras doenças do tecido conectivo com sintomas de esclerodermia do fenômeno de Raynaud primário, ou seja, aquele que não está relacionado à doença reumatológica (28). Além de diagnóstico, este exame pode ser utilizado como marcador de atividade e gravidade da doença (29). O achado

típico da capilaroscopia na ES é o alargamento das alças dos capilares ungueais e áreas avascularizadas em seu entorno (30).

- Telangiectasias

Outra alteração da microvasculatura característica da ES são as telangiectasias, que se formam através de dilatações das vênulas pós capilares, sem indício de inflamação ou neovascularização (31). No início da ES surge com maior frequência na forma cutânea limitada, porém na doença avançada está presente nas duas formas (27). Observou-se proliferação endotelial aumentada nos vasos com telangiectasias através do estudo da pele de portadores de ES (32).

- Vasculopatia Sistêmica

Todos os órgãos alvo da ES apresentam algum tipo de injúria vascular.

No rim pode ocorrer a crise renal esclerodérmica que é a associação de hipertensão arterial maligna e insuficiência renal aguda, decorrente de vasoespasmo renal e doença das artérias renais interlobulares (33).

No trato gastrointestinal suspeita-se de injúria vascular desencadeando disfunção neurogênica, dismotilidade intestinal, perda de músculo liso das paredes intestinais e fibrose tecidual (34).

No coração há evidência de doença microvascular gerando eventos isquêmicos e necrose tecidual, ambos devido a oclusão arterial ou vasoespasmo intermitente, o qual também é descrito como fenômeno de Raynaud intramiocárdico (35,36).

A disfunção erétil é uma complicação comum decorrente da doença microvascular e fibrose tecidual (37).

No pulmão também ocorre injúria vascular, sendo a hipertensão arterial pulmonar uma das complicações da ES (38).

CARDÍACO

As alterações cardíacas mais comuns na ES são secundárias à hipertensão arterial sistêmica ou pulmonar. As lesões primárias são: arritmias e distúrbios do sistema de condução, fibrose miocárdica, miocardite associada à miosite, insuficiência cardíaca, pericardite e derrame pericárdico (39).

Os pacientes que apresentam cardiopatia sintomática devido a ES têm pior prognóstico (39).

As arritmias e os distúrbios do sistema de condução são comuns, visto que a palpitação é a queixa cardiológica mais comum dos portadores de ES. Geralmente acontecem após fibrose miocárdica e do sistema de condução (40). Alguns pacientes têm morte súbita e a arritmia ventricular fatal é a principal causa.

A fibrose miocárdica focal é bastante característica da ES, pois acontece devido a episódios freqüentes de espasmo das coronárias de pequeno calibre, e com isso é facilmente diferenciada daquela decorrente de doença aterosclerótica coronária. A fibrose pode ocasionar tanto disfunção ventricular sistólica quanto diastólica (41).

O derrame pericárdico é marcador de atividade e/ou doença grave. Existe evidência no *pos mortem* de acometimento pericárdico em 70 a 80% dos pacientes, já a pericardite sintomática ocorre no máximo em 20% dos casos. Há uma associação entre derrame pericárdico e insuficiência renal aguda (39).

RENAL

Através de autópsia observou-se algum grau de lesão renal em pelo menos 60 a 80% dos pacientes com ES forma cutânea difusa (42). As alterações mais comuns são: proteinúria, elevação leve da creatinina sérica, e hipertensão, outro acometimento menos freqüente e mais grave é a crise renal esclerodérmica (43).

A nefropatia causada pela ES era a principal causa de morte destes pacientes antes dos anos 80. Com a introdução das drogas inibidoras da enzima de conversão da angiotensina (IECA) houve uma melhora significativa no prognóstico da crise renal esclerodérmica, com aumento da sobrevivência em 1 ano de 15% para 76% (44).

Como já foi descrito previamente a crise renal esclerodérmica é a associação de hipertensão arterial maligna e insuficiência renal aguda, acontecendo com mais freqüência na forma cutânea difusa e durante os quatro anos iniciais da doença (33,45). Existem situações que tornam a nefropatia mais grave, como a idade avançada, creatinina sérica maior ou

igual a 3mg/dL, o descontrole da pressão arterial sistêmica e a presença de insuficiência cardíaca (44).

GASTROINTESTINAL

Qualquer porção do tubo digestivo pode ser acometida pela ES, e isso ocorre na grande maioria dos pacientes (90%) independente da forma da doença, tanto a cutânea limitada quanto a difusa. O órgão mais afetado é o esôfago, acontecendo em 50 a 80% dos casos (46), e a alteração mais comum é o refluxo gastroesofágico. O refluxo crônico pode causar esofagite e ulcerações, e posteriormente hipomotilidade esofágica além de incompetência do esfíncter inferior do esôfago, problemas que geram disfagia, estase de alimentos no esôfago, e nos casos mais intensos a aspiração deste conteúdo para a traquéia e brônquios (47). O prejuízo na motilidade esofágica favorece a proliferação fúngica, e por isso a candidíase esofágica não é tão rara (48).

Outras afecções são a gastroparesia, dilatação e hipomotilidade intestinal, podendo causar distensão abdominal, flatulência, náuseas e diarreia.

NEUROMUSCULAR

Recentemente observou-se que o envolvimento neurológico não é tão raro, as manifestações mais freqüentes são: miopatia, neuropatia periférica, mielopatia e doença cerebrovascular (48).

ONCOLOGIA

Alguns autores sugerem a associação da ES com risco elevado de neoplasia, e o câncer de pulmão parece ser o mais comum, mas esta possível ligação ainda não foi confirmada devido ao pequeno número de pacientes nos estudos (38).

1.7 Esclerose Sistêmica e Pulmão

Aproximadamente 2/3 dos portadores de ES apresentam algum grau de doença pulmonar. O pulmão é o segundo órgão interno mais afetado, ficando atrás apenas do esôfago, e atualmente é a principal causa de morte na ES (50).

Existem duas alterações principais: a doença intersticial também conhecida como alveolite fibrosante (51), e a doença vascular, sendo a hipertensão arterial pulmonar a manifestação mais comum. Além destes acometimentos os outros, menos comuns, são:

- Pneumonia aspirativa: decorrente do refluxo gastroesofágico e alteração da motilidade esofágica com estase alimentar.
- Bronquiectasias: ficaram mais evidentes após o advento da tomografia de tórax de alta resolução.
- Pneumonite por droga: alguns imunomoduladores podem lesar o pulmão.
- Derrame pleural: ocorre em menos de 10% dos pacientes e geralmente é pouco sintomático (52).
- Neoplasia: os portadores da forma cutânea difusa têm risco aumentado de desenvolver câncer pulmonar.

1.8 Doença Intersticial

Histopatologia

Observou-se, através de biópsia pulmonar, que o padrão histológico presente em mais de 70% dos casos é o de pneumonite intersticial não usual (NSIP), seguido de pneumonite intersticial usual (UIP) e pulmão terminal (*end stage lung*) (53).

A fisiopatologia ainda não é totalmente clara, mas é certo que há uma junção de acontecimentos como inflamação, destruição e fibrose desencadeando as lesões dos órgãos. Na fase de reparação há liberação principalmente de IL-4, que estimula a síntese de colágeno e a proliferação de fibroblastos. Outro evento muito importante é o stress oxidativo danificando células e estimulando novamente o processo de cicatrização (54).

A fibrose pulmonar está associada com a presença do anticorpo anti-topoisomerase I (Scl-70) e incidência aumentada da MHC classe II DR3/DR52.

Manifestação Clínica

No início da doença intersticial os pacientes geralmente são assintomáticos, com a progressão da doença podem sentir dispnéia, tosse seca e limitação aos esforços físicos.

Na ausculta pulmonar é comum estertores crepitantes em “velcro” nas bases.

No estagio final da doença intersticial pode haver cianose e sinais de *cor pulmonale* (55).

Métodos Diagnósticos

A tomografia de tórax de alta resolução tem sensibilidade elevada para detecção de pneumopatia intersticial. O achado mais comum é o vidro fosco subpleural, bilateral e basal (56). Com a evolução do quadro surgem as bronquiectasias de tração e faveolamento.

A prova de função pulmonar com medida da capacidade de difusão através do monóxido de carbono (DLCO) é, além da tomografia, outro exame imprescindível no diagnóstico e durante o acompanhamento da doença. Ela tem utilidades importantes, como a de definir a intensidade do acometimento da função pulmonar, avaliar resposta terapêutica e progressão da doença. A primeira alteração funcional é a redução da capacidade de difusão, presente em 70% dos pacientes portadores de intersticiopatia (57). Os resultados típicos são a redução da CPT e volumes pulmonares caracterizando um distúrbio ventilatório restritivo, e a redução significativa da DLCO (55,57), mostrando que a principal mudança ocorre na membrana alvéolo-capilar. A perda de capacidade de difusão se correlaciona com os achados tomográficos e é sinal de pior prognóstico (57). A queda mais acentuada da CVF ocorre nos primeiros três anos da doença, mostrando que a inflamação e a fibrose pulmonar surgem cedo.

O teste de caminhada de 6 minutos também é útil para mostrar comprometimento da troca gasosa, mas em alguns pacientes sua realização é prejudicada devido ao fenômeno de Raynaud.

A biópsia pulmonar não é necessária para que o diagnóstico de doença intersticial seja firmado, a tomografia e a prova de função pulmonar são suficientes. Seu valor prognóstico também é questionável. Em estudo histopatológico observou-se que 76% dos casos eram de NSIP e 11% tinham padrão de UIP, no entanto, esse achado não se refletiu no tempo de sobrevida em 5 anos, já que não houve diferença significativa entre os dois tipos histológicos (53).

Prognóstico

A presença da doença intersticial implica em aumento da mortalidade para os portadores. Marcadores de pior prognóstico são a baixa capacidade de difusão de CO e a queda abrupta da DLCO em 3 anos. Um estudo retrospectivo com 953 pacientes mostrou que os portadores de doença intersticial grave tinham sobrevida em 9 anos de apenas 30%, enquanto os que não apresentavam nenhum acometimento grave de órgão interno tinham 72% (58).

1.9 Doença Vascular

Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)

A principal alteração vascular no pulmão causada pela ES é a HAP, definida como pressão média de artéria pulmonar em repouso maior ou igual a 25mmHg, medida através da cateterização do coração direito (59). Ela pode ocorrer isolada ou associada à doença intersticial.

A prevalência varia de acordo com o estudo e principalmente com o método de detecção, mas estima-se que ocorra em torno de 10 a 15% dos pacientes com ES, confirmado com cateterismo direito (60).

Dados dos EUA sugerem que a HAP idiopática é duas vezes mais comum do que a HAP da ES, surgindo a hipótese de que alguns diagnósticos de HAP não estejam sendo feitos nos portadores de ES (61).

Manifestação Clínica

No começo os pacientes são assintomáticos, com a evolução da doença a principal queixa é a dispnéia progressiva aos esforços, outros sintomas mais raros são: a dor torácica, a pré-síncope ou síncope. Ao exame físico pode haver uma proeminência sonora da segunda bulha devido ao componente pulmonar (P2), sopro da regurgitação tricúspide, e sinais clínicos de *cor pulmonale*.

Métodos Diagnósticos

A radiografia de tórax quando alterada tem aumento dos hilos pulmonares com sinal de oliguemia bilateral.

Se houver apenas doença vascular a tomografia de tórax será quase normal, apenas com o calibre da artéria pulmonar acima do normal e o parênquima sem alterações.

A prova de função pulmonar é um excelente exame, pois sugere o diagnóstico e o prognóstico também. A alteração encontrada é bem característica de HAP de qualquer etiologia, que é uma importante queda da capacidade de difusão com preservação dos volumes pulmonares. Indivíduos com DLCO < 50% do previsto têm pior prognóstico, e aqueles com valor < 25% do previsto tem em média um ano de expectativa de vida (62).

O ecocardiograma é um exame imprescindível, pois através dele pode ser estimada a pressão da artéria pulmonar, se houver refluxo tricúspide. Um estudo comparou o ecocardiograma com o cateterismo, considerado o exame padrão ouro, e observou-se que o ecocardiograma apresenta sensibilidade de 47% e especificidade de 97% (63).

O cateterismo das câmaras direitas é o exame padrão ouro para determinar a pressão arterial pulmonar, porém por ser invasivo e usar contraste não está indicado para todos os pacientes, apenas para os que apresentam disfunção ou dilatação ventricular direita, ou que tem risco elevado de desenvolver a doença, mas o ecocardiograma foi duvidoso (64).

Outro exame não invasivo é a dosagem sérica do NT-proBNP (*N terminal pro-brain natriuretic peptide*), que se correlacionou com a gravidade da doença, bem como preditor de sobrevida na HAP idiopática. Alguns estudos mostraram que o NT-proBNP na ES pode prever o aparecimento da HAP, e a sobrevida destes pacientes (65).

Prognóstico

Pacientes com HAP pela ES tem resposta à terapia e evolução piores do que os portadores de HAP idiopática (64). Os motivos dessa diferença ainda são desconhecidos, mas algumas hipóteses foram sugeridas como uma resposta autoimune, celular e inflamatória mais intensa na ES, a presença de comorbidades na ES como a cardiopatia e o acometimento intersticial, e a deficiência dos métodos para avaliar melhora clínica e resposta terapêutica da HAP pela ES (66). Portanto, o prognóstico dos pacientes com ES, que desenvolvem HAP, ainda é muito sombrio, com taxas de mortalidade elevadas.

1.10 Patologia Vascular e Esclerose Sistêmica

Apesar de não ser uma teoria totalmente comprovada, alguns estudos sugerem a possível fisiopatologia responsável pela lesão vascular na esclerose sistêmica.

Suspeita-se de ativação das células endoteliais da microvasculatura levando a: disfunção celular, expressão de moléculas de adesão, recrutamento leucocitário, adesão e ativação plaquetária e infiltração perivascular com exsudato.

A camada íntima do vaso se torna espessa, devido à proliferação local dos miofibroblastos, que foram estimulados pelos fatores de crescimento tecidual, stress oxidativo e imunomediadores. Normalmente o aumento da camada íntima causa a redução do lumen do vaso, o que diminui o fluxo sanguíneo local. Outros fatores que podem contribuir para o estreitamento da luz do vaso é o desequilíbrio entre a coagulação, que encontra-se hiperestimulada, e a fibrinólise reduzida.

A disfunção endotelial gera um aumento dos fatores vasoconstritores, como a endotelina-1, e redução dos vasodilatadores: óxido nítrico (NO) e prostaciclina.

Há uma diminuição da sensibilidade dos nervos sensoriais aos peptídeos dilatadores, e os adrenoreceptores α_{2c} (α_{2c} – AR) da musculatura lisa vascular ficam mais sensíveis ao estímulo vasoconstritor do frio e do stress.

Episódios consecutivos de vasoespasma intenso levam a oclusão da microcirculação com injúria tecidual pela isquemia-reperfusão constante e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (67).

Ainda não se sabe se a lesão endotelial é responsável por toda a cascata de eventos, e nem o mecanismo da injúria celular, serão necessários novos estudos para elucidar essas questões.

2. HIPÓTESE

Presença de lesão e ativação endotelial das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre na ES que poderão ser avaliadas através do microscópio confocal de varredura a laser e da quantificação das moléculas de adesão intercelular - 1 (ICAM-1) e molécula de adesão da célula vascular - 1 (VCAM-1).

3. OBJETIVO

Avaliar a parede das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre de pacientes portadores de ES, através do microscópio confocal de varredura a laser e da quantificação das moléculas de adesão: ICAM-1, e VCAM-1, comparando em seguida com as artérias de pulmões normais (controles).

4. MÉTODOS

Neste estudo quantitativo e controlado foram analisadas 40 artérias pulmonares de pacientes submetidas à biópsia pulmonar a céu aberto, que realizam acompanhamento clínico na disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, e que tem diagnóstico confirmado de ES de acordo com os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Reumatologia (ARA) (17).

Obtivemos as informações médicas destas pacientes, como: idade, evolução clínica, exames laboratoriais inclusive os sorológicos, tomografia computadorizada de tórax, provas de função pulmonar e ecocardiograma, através da análise dos prontuários eletrônicos das mesmas, que estão no sistema de dados da disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Para a comparação das artérias analisadas com o microscópio confocal, foram usadas 16 artérias controles provenientes de pulmões normais de pacientes submetidos à necropsia, e que não tiveram como causa do óbito problemas pulmonares. Estes controles foram usados previamente na Tese de Doutorado de Alfredo Santana, que avaliou através do microscópio confocal a laser as artérias de pacientes com Granulomatose de Wegener (68).

Todo o preparo das lâminas foi realizado no Laboratório de Investigação Médica 05 (LIM 05) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

Foram realizados cortes de 20 μm de espessura nos blocos de parafina, os quais tiveram que ser desparafinados e aquecidos em citrato a 10mM e pH=6,0. Em seguida foi usado o anticorpo monoclonal de rato anti-célula endotelial humana (marcador de antígeno CD 34 – Novocastra Laboratories) na diluição de 1/400, com o objetivo de marcar o endotélio vascular. Outro anticorpo usado neste momento como anticorpo secundário, foi o anticorpo monoclonal de rato conjugado com isômero de isocianato de fluoresceína (FITC) na diluição 1/40.

A análise do tecido foi feita através do microscópio confocal de varredura a laser do tipo ZEISS LSM 510 Meta, localizado no 9º andar do Instituto do Coração – InCor.

Em cada lâmina buscávamos artérias marcadas com o anticorpo anti-CD34. O método usado era o de percorrer o tecido pulmonar a partir do centro em direção a periferia fazendo movimentos em espiral. As imagens selecionadas foram gravadas para posterior análise e medição.

As medidas das artérias foram feitas através do programa Zeiss-LSM Image Browser, que pode ser obtido gratuitamente pelo site da empresa Carl-Zeiss (69). O programa fornece ferramentas para selecionar, fotografar e medir. Ao utilizar retas pode-se quantificar o diâmetro, e ao circundar o vaso obtém-se o perímetro externo, o interno, a área total do vaso e a área do lúmen. Quando o usuário termina de desenhar a reta ou circundar a estrutura desejada, o programa fornece automaticamente as medidas em μm e μm^2 (figura 2 e 3).

Como o objetivo do trabalho foi o de analisar artérias de pequeno e médio calibre, foram selecionadas apenas as que tinham diâmetro externo entre 20 μm e 300 μm . Outro critério de seleção usado foi a relação entre o menor e maior diâmetro externo de até 0,6, para nos certificarmos de que o vaso escolhido teve seu corte no eixo transversal.

Através do programa foram obtidas as medidas do perímetro externo (PE) e perímetro interno (PI) em μm , da área total do vaso (ATV) e da área do lúmen (AL) em μm^2 . Em seguida subtraímos a AL da ATV ($ATV - AL$), e calculamos a relação entre a AL e ATV [$(AL/ATV) \times 100$]. Todas as medidas das artérias provenientes das pacientes com ES foram comparadas com as medidas das artérias controles.

Figura 1. Sistema de microscopia confocal a laser.

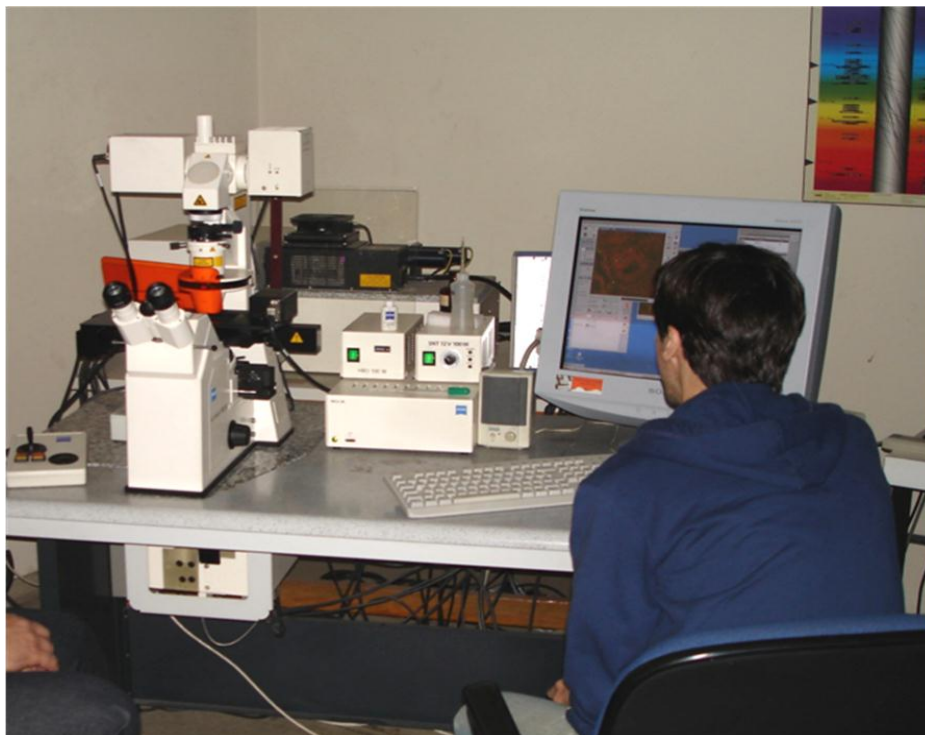


Figura 2. Foto da artéria do grupo ES vista através do microscópio confocal a laser.

(Demonstração do programa LSM Browser fornecendo as medidas: diâmetro externo, ATV, diâmetro interno e AL)

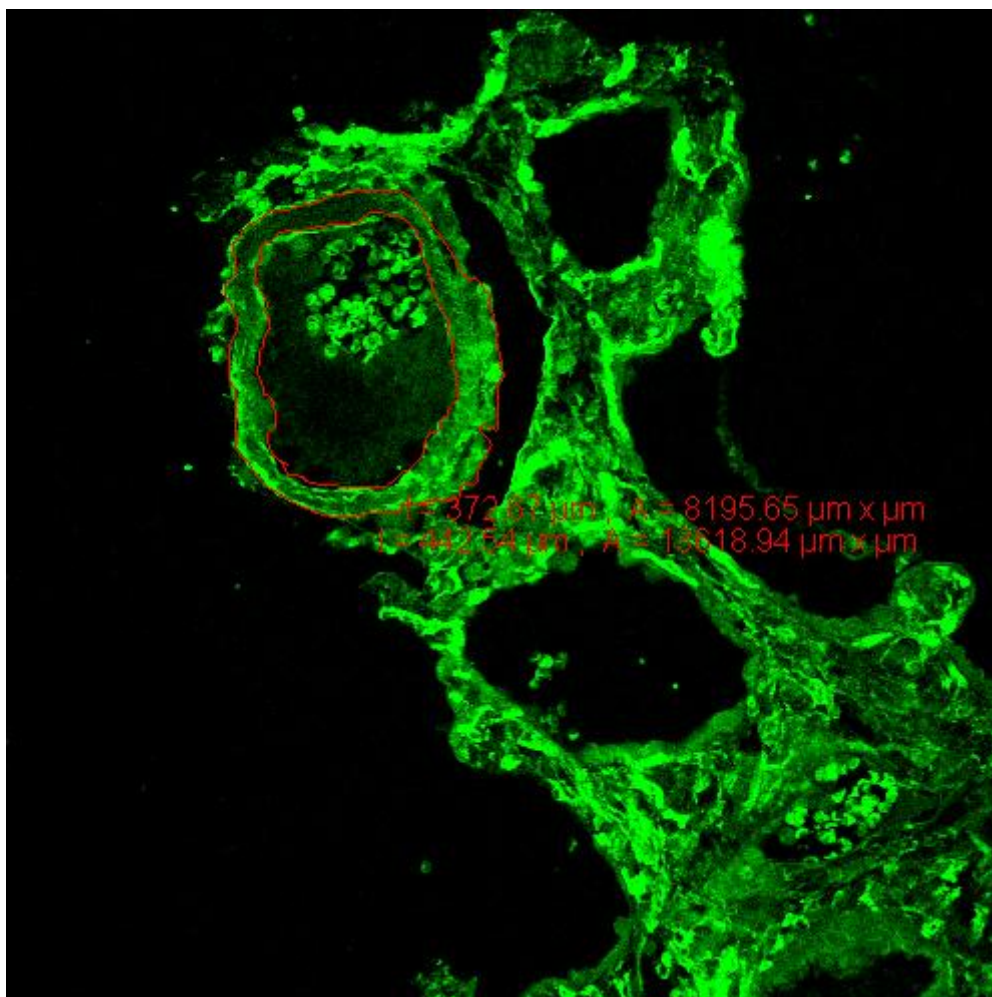
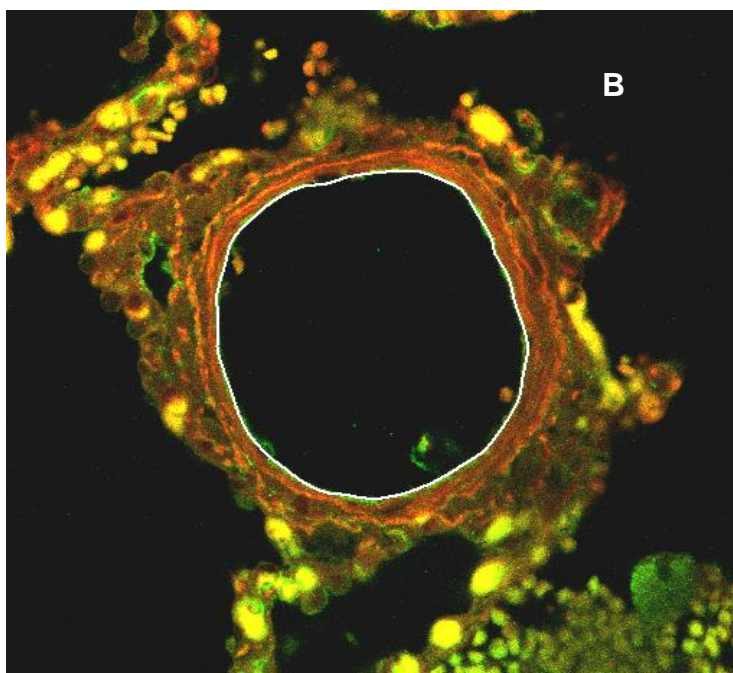
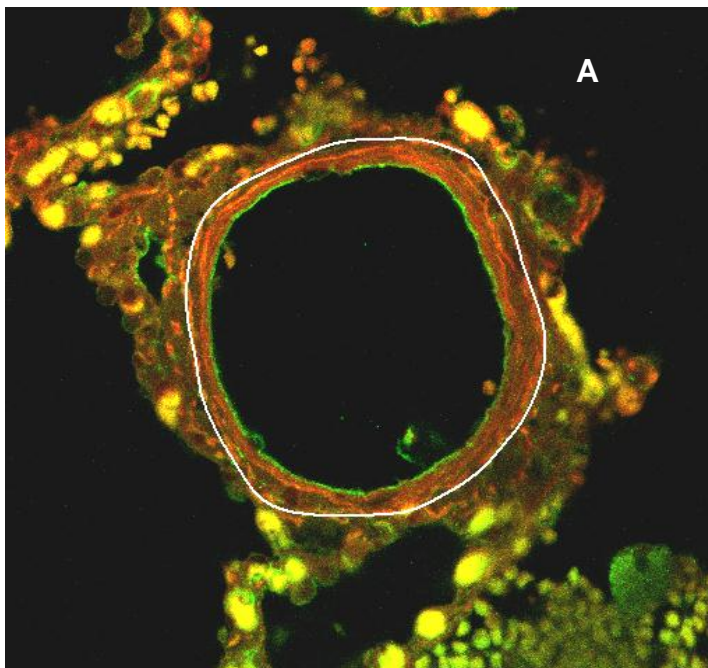


Figura 3. Fotos da artéria do grupo controle vista através do microscópio confocal a laser.
(Demonstração do programa LSM Browser medindo os diâmetros externo (A) e interno (B) da artéria)



Análise imunohistoquímica para I-CAM-1 e V-CAM-1

Para a realização da imunohistoquímica os blocos foram submetidos a cortes de 3µm de espessura e montados sobre lâminas de microscopia salinizadas, as quais foram desparafinadas. Após este procedimento, o tecido foi hidratado para a recuperação antigênica.

Em seguida foi feito o bloqueio das peroxidases endógenas e de sítios inespecíficos, para finalmente realizar a adição de anticorpos primários ICAM-1 (NCL-CD54-307 - ICAM monoclonal de camundongo, clone 23G12, Laboratório Leica Biosystems - Divisão Novocastra, New Castle, Inglaterra) e VCAM-1 (E-10 sc-13160, monoclonal de camundongo, Laboratório Santa Cruz biotechnology, California, USA), cada um em uma lâmina pré-processada e incubada *over-night* a temperatura de 4° a 8°C.

Utilizou-se o sistema de amplificação e revelação dos anticorpos. Para cada marcador houve um controle positivo e um negativo.

Todos os controles foram processados simultaneamente aos casos.

Percorreu-se o tecido pulmonar em busca de vasos a partir do centro em direção a periferia fazendo movimentos em espiral. Em cada das sete lâminas dos casos e as duas dos controles analisamos dez campos.

Para determinar os índices de expressão dos antígenos foi usada a técnica de *point-counting*, através de um retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas (70). Verificou-se o grau de expressão dos diferentes marcadores pelo endotélio dos vasos de pequeno e médio calibre através do aumento de 400 vezes do microscópio.

Para corrigir os dados, tendo em vista as diferenças de expansão dos tecidos das biópsias estudadas, não foram considerados os pontos que não incidiram em área sólida.

Os valores foram expressos em porcentagem de pontos positivos sobre o endotélio pelo total de pontos nos vasos, segundo a fórmula:

$$PPONTOS = (Pi \times 100) / PVASOS$$

Onde:

PPONTOS: porcentagem corrigida de pontos marcados

Pi: número de pontos que incidiram sobre a positividade do marcador imunohistoquímico

PVASOS: total de pontos que incidiram sobre os vasos.

A PPONTOS dos casos e controles, tanto do I-CAM-1 quanto V-CAM-1, surgiu a partir da soma dos resultados Pi e PVASOS dos 10 campos analisados.

Figura 4. Foto da imunohistoquímica – ICAM-1 do grupo ES.

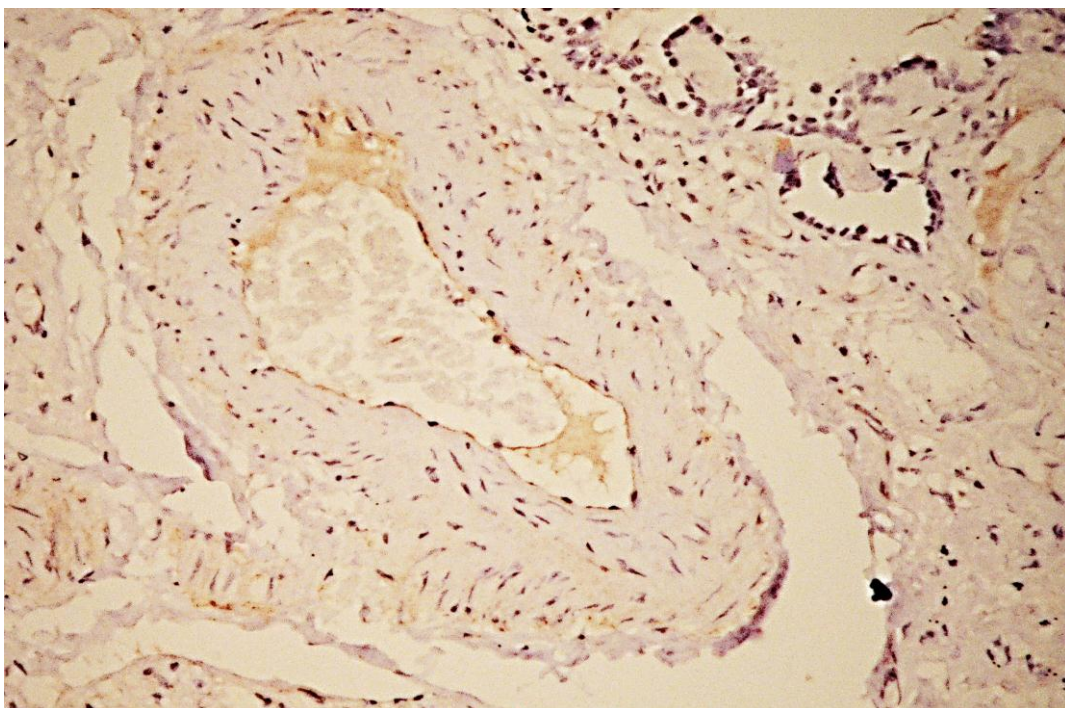


Figura 5. Foto (2) da imunohistoquímica – ICAM-1 do grupo ES.

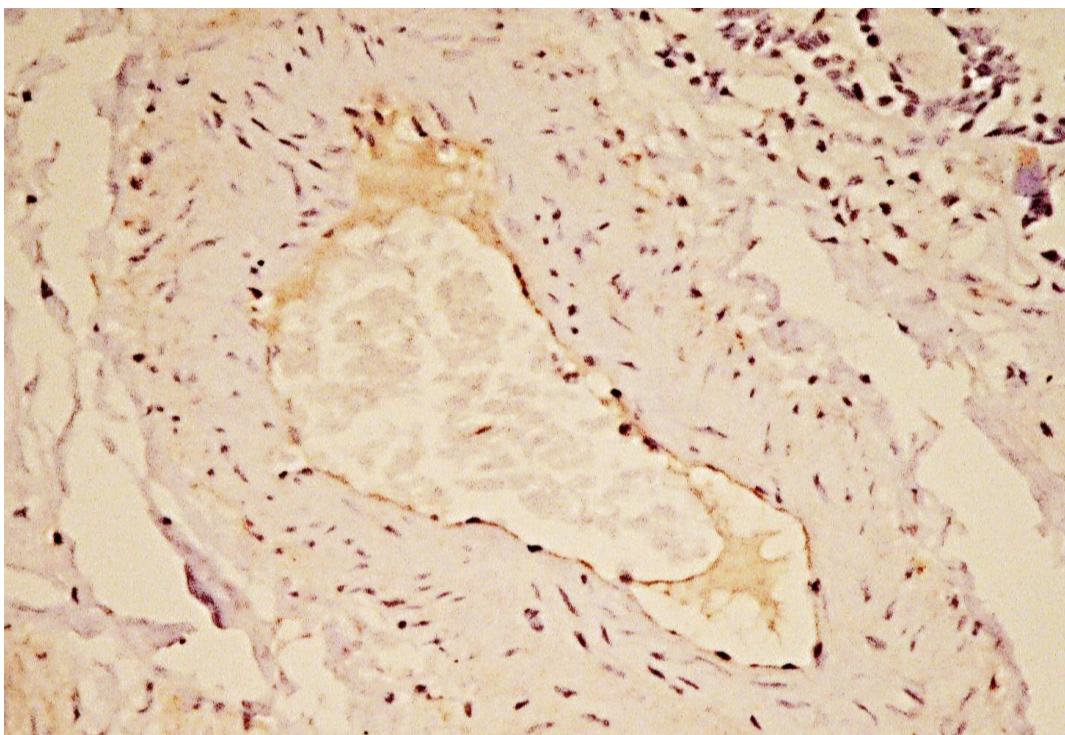


Figura 6. Foto da imunohistoquímica – VCAM-1 do grupo ES.

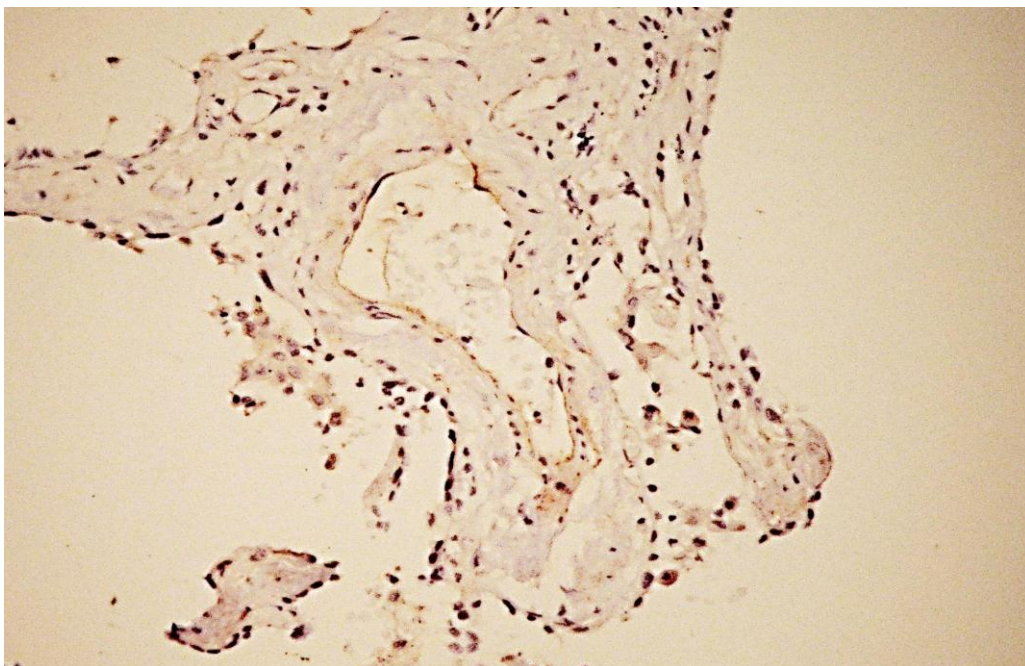


Figura 7. Foto (2) da imunohistoquímica – VCAM-1 do grupo ES.

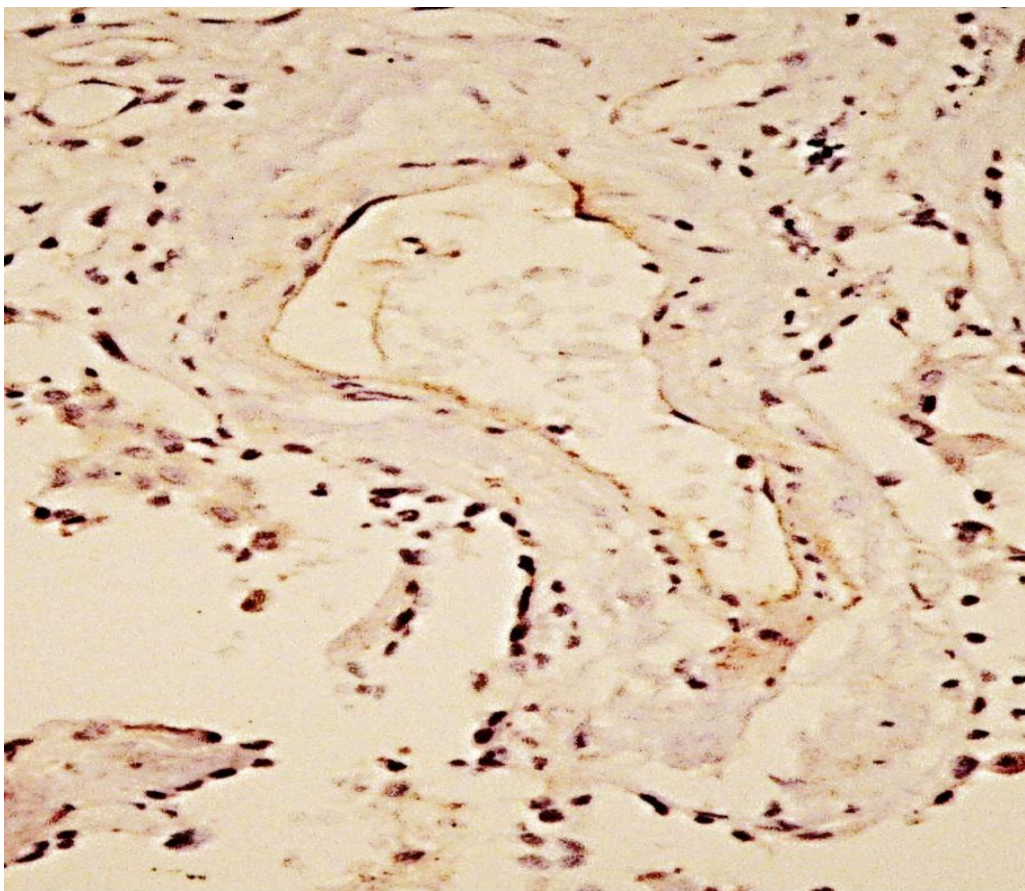
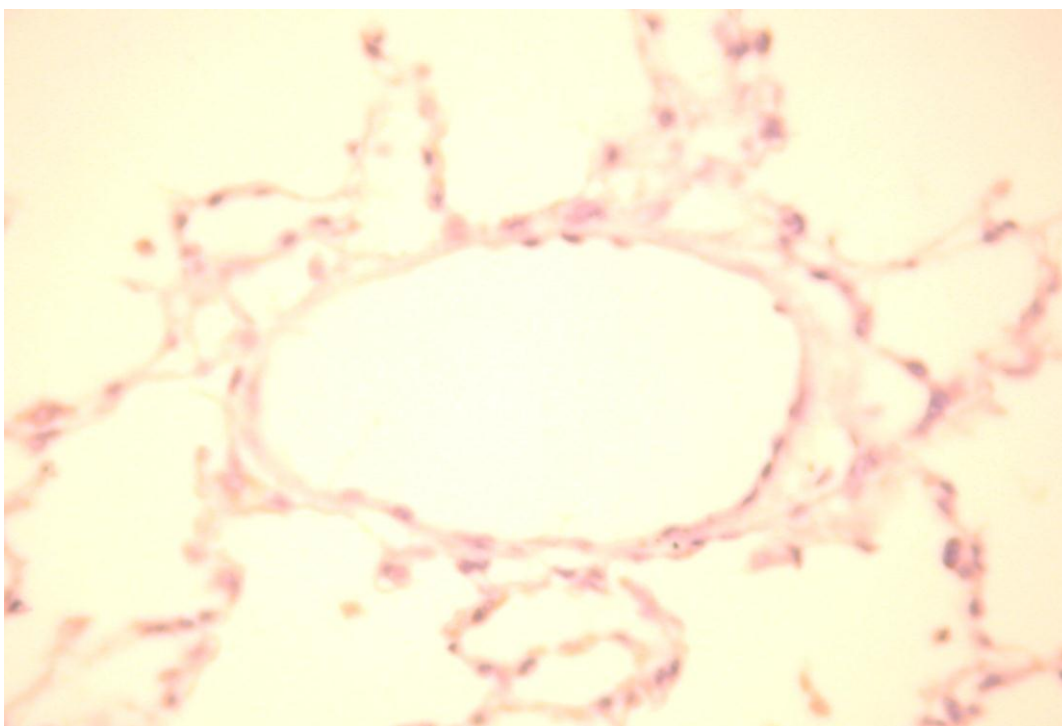


Figura 8. Foto da imunohistoquímica – ICAM-1 do grupo controle.



5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão para as variáveis contínuas. As variáveis categóricas foram expressas em percentuais. Foi utilizado o teste de Wilcoxon signed-rank, teste de hipóteses não-paramétricos e não-pareados para dados ordinais, sendo usado para dados obtidos a partir de medidas repetidas e de desenhos com dados emparelhados. Para as variáveis categóricas utilizou-se o teste exato de Fisher. Considerou-se $p < 0,05$ como significância estatística.

6. RESULTADOS

Observamos através da média da ATV do grupo ES e do grupo controle, que as artérias analisadas do grupo ES são menores do que as do grupo controle: $18082,46 \mu\text{m}^2 \pm 14351$ com mínimo de $3453,65 \mu\text{m}^2$ e máximo de $63890,35 \mu\text{m}^2$ da ES, e $32970,22 \mu\text{m}^2 \pm 11356$ com mínimo de $17689,50 \mu\text{m}^2$ e máximo de $59227,84 \mu\text{m}^2$ do controle, $p = 0,026$ (tabela 1A, 1B, 2 e 5). Apesar da significância estatística, as artérias selecionadas apresentam diâmetros externos entre $20 \mu\text{m}$ e $300 \mu\text{m}$, garantindo a análise de artérias de pequeno e médio calibre.

A AL também é significativamente menor no grupo ES: $6842,57 \mu\text{m}^2 \pm 6836$ com mínimo de $1155,46 \mu\text{m}^2$ e máximo de $35393,32 \mu\text{m}^2$ da ES, e $24707,08 \mu\text{m}^2 \pm 8717$ com mínimo de $14294,97 \mu\text{m}^2$ e máximo de $45659,25 \mu\text{m}^2$ do controle, $p = 0,003$ (tabela 1A, 1B, 2 e 5). A diferença entre os dois grupos é maior na AL do que na ATV, sugerindo que o espessamento das camadas das artérias na ES pode ser responsável pela menor AL deste grupo.

A suspeita de que as artérias na ES estão mais inflamadas e por isso apresentam aumento da espessura de suas camadas, é confirmada através dos valores obtidos com as operações: $ATV - AL$ e $AL/ATV \times 100$.

A diferença entre a ATV e a AL foi maior no grupo ES: $11239,89 \mu\text{m}^2 \pm 9153$ com mínimo de $1631,61 \mu\text{m}^2$ e máximo de $41983,96 \mu\text{m}^2$ da ES, e $8263,14 \mu\text{m}^2 \pm 3934$ com mínimo de $3394,53 \mu\text{m}^2$ e máximo de $16590,36 \mu\text{m}^2$ do controle, $p = 0,048$ (tabela 3A, 3B, 4 e 5).

A relação $AL/ATV \times 100$ foi significativamente menor no grupo ES do que no controle: $38,36\% \pm 15\%$ com mínimo de $7,58\%$ e máximo de $62,95\%$

da ES, e $75,44\% \pm 7\%$ com mínimo de 56,05% e máximo de 81,90% do controle, $p < 0,0001$ (tabela 3A, 3B, 4 e 5).

Outro achado foi o da intensa variação da AL do grupo ES, que não está presente no grupo controle, corroborando a hipótese de acometimento das artérias pulmonares na ES, com inflamação, infiltração celular em suas camadas, ativação endotelial e tardiamente fibrose. Talvez tenhamos visualizado artérias do grupo ES em diferentes estágios de acometimento, e por isso a intensa variação da AL.

Tabela 1A. Áreas das artérias do grupo ES (em μm^2).

Paciente	Área Total do Vaso	Área do Lúmen
1	21.410,99	10.069,85
	3453,65	1.822,04
	8271,03	3.081,18
	22.649,26	6.598,45
2	15.250,92	1.155,46
	15.293,63	3.336,24
	20.679,87	6.882,91
	17.981,91	3.963,41
	15.241,66	3.460,04
3	56.003,68	28.670,79
	28.727,78	8.807,12
	13.618,94	8.195,65
	14.706,75	8.316,67
	16.268,17	5.439,66
4	16.112,44	9.564,06
	63.890,35	35.393,32
	40.823,66	7.509,20
	16.519,99	9.682,49
5	9.498,92	4.699,22
	12.882,46	4.083,78
	15.773,02	6.265,52

Tabela 1B. Áreas das artérias do grupo ES (em μm^2).

Paciente	Área Total do Vaso	Área do Lúmen
6	15.127,67	5643,87
	20.097,59	10.713,47
	8.121,20	2.019,23
7	10.671,92	3.295,23
	17.257,71	4.737,69
	7.722,44	3.643,95
	15.963,35	4.880,62
8	8.696,00	5.473,81
	6.625,65	1.318,54
	13.021,83	3.041,79
9	13.061,24	7.467,47
	5.074,78	1.764,52
	5.691,72	2.980,93
	32.751,36	3.149,44
10	4.277,08	1.794,23
	61.435,91	19.451,95
	15.518,78	7.924,54
	9.049,80	4.463,03
	8.073,26	2.941,57

Tabela 2. Áreas das artérias do grupo Controle (em μm^2).

Paciente	Área Total do Vaso	Área do Lúmen
1C	30580,44	22192,55
	50305,63	39337,74
	23963,48	18359,02
	39477,12	31837,27
2C	29898,45	23323,02
	24795,34	18799,99
	20058,94	16427,72
	59227,84	45659,25
3C	34455,89	27783,00
	41996,94	32490,03
	17689,50	14294,97
	20003,96	16103,19
4C	37955,05	23663,10
	26682,97	20780,07
	37747,85	21157,49
	32684,22	23104,92

Tabela 3A. Dados da ATV - AL (em μm^2) e AL/ATV x 100 (em %) do grupo ES.

Paciente	ATV - AL	AL/ATV x 100
1	11.341,14	47,03
	1.631,61	52,76
	5.189,85	37,25
	16.050,81	29,13
2	14.095,46	7,58
	11.957,39	21,81
	13.796,96	33,28
	14.018,50	22,04
	11.781,62	22,70
3	27.332,89	51,19
	19.920,66	30,66
	5.423,29	60,18
	6.390,08	56,55
	10.828,51	33,44
4	6.548,38	59,36
	28.497,03	55,40
	33.314,46	18,39
	6.837,50	58,61
5	4.799,70	49,47
	8.798,68	31,70
	9.507,50	39,72

Tabela 3B. Dados da ATV - AL (em μm^2) e AL/ATV x 100 (em %) do grupo ES.

Paciente	ATV - AL	AL/ATV x 100
6	9.483,80	37,31
	9.384,12	53,31
	6.101,97	24,86
7	7.376,69	30,88
	12.520,02	27,45
	4.078,49	47,19
	11.082,73	30,57
8	3.222,19	62,95
	5.307,11	19,90
	9.980,04	23,36
9	5.593,77	57,17
	3.310,26	34,77
	2.710,79	52,37
	29.601,92	9,62
10	2.482,85	41,95
	41.983,96	31,66
	7.594,24	51,06
	4.586,77	49,32
	5.131,69	36,44

Tabela 4. Dados da ATV - AL (em μm^2) e AL/ATV x 100 (em %) do grupo Controle.

Paciente	ATV - AL	AL/ATV x 100
1C	8387,89	72,57
	10967,89	78,19
	5604,46	76,61
	7639,85	80,64
2C	6575,43	78,00
	5995,35	75,82
	3631,22	81,89
	13568,59	77,09
3C	6672,89	80,63
	9506,91	77,36
	3394,53	80,81
	3900,77	80,50
4C	14291,95	62,34
	5902,90	77,87
	16590,36	56,04
	9579,30	70,69

Tabela 5. Média, desvio-padrão, valor mínimo e máximo das áreas e relações da ES e grupo Controle.

	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
ATV (μm^2) ES	18082,45	$\pm 14351,50$	3453,65	63890,35
AL (μm^2) ES	6842,57	$\pm 6836,88$	1155,46	35393,32
ATV – AL (μm^2) ES	11239,88	$\pm 9153,07$	1631,61	41983,96
AL/ATV x 100 (%) ES	38,51	$\pm 14,77$	7,58	62,95
ATV (μm^2) Controle	32970,22	$\pm 11356,98$	17689,50	59227,84
AL (μm^2) Controle	24707,08	$\pm 8717,87$	14294,97	45659,25
ATV – AL (μm^2) Controle	8263,14	$\pm 3934,32$	3394,53	16590,36
AL/ATV x 100 (%) Controle	75,44	$\pm 7,10$	56,05	81,90

Tabela 6. Dados das pacientes com ES submetidas à biópsia.

Paciente	Idade da biópsia (anos)	PFP (% do previsto)	PSAP (mmHg)	Biópsia
1	41	CVF = 72% VEF1 = 77% CPT = 75% DLCO = 72%	41	NSIP
2	48	CVF = 53% VEF1 = 61% CPT = 70% DLCO = 32%	80	NSIP
3	37	CVF = 48% VEF1 = 58% CPT = 58% DLCO = 74%	sem sinais de HAP	Fibrose pulmonar
4	38	CVF = 69% VEF1 = 75%	47	NSIP
5	40	CVF = 75% VEF1 = 82% CPT = 76% DLCO = 70%	FE 0,73 sem sinais de HAP	NSIP
6	35	CVF = 70% VEF1 = 78% CPT = 72% DLCO = 77%	54	NSIP
7	50	CVF = 79% VEF1 = 84%	sem sinais de HAP	UIP incipiente
8	45	CVF = 61% VEF1 = 67% CPT = 68% DLCO = 34%	FE 0,74 sem sinais de HAP. Insuficiência mitral leve	Fibrose centro lobular
9	46	CVF 38% VEF1 42%	FE 0,67 alteração da complacência	UIP
10	45	CVF 72% VEF1 86% CPT 74% DLCO 75%	sem sinais de HAP	NSIP

(FE: fração de ejeção, HAP: hipertensão arterial pulmonar, NSIP: pneumonia intersticial não específica, UIP: pneumonia intersticial usual)

Gráfico 1. Área Total do Vaso dos grupos ES e Controle (em μm^2)

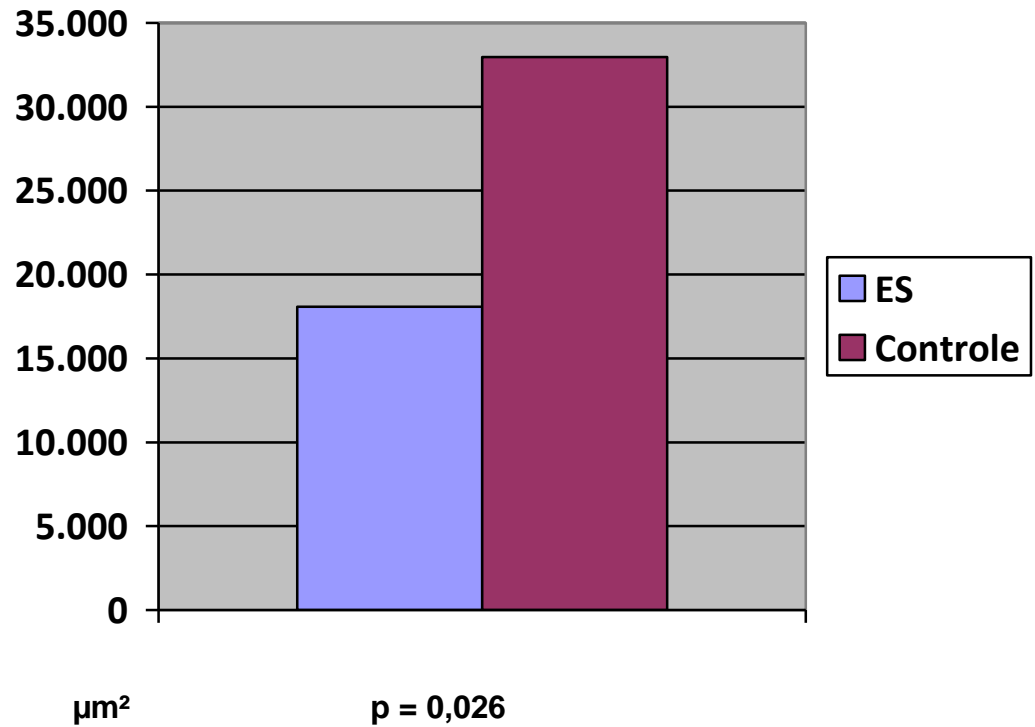


Gráfico 2. Área do Lúmen dos grupos ES e Controle (em μm^2)

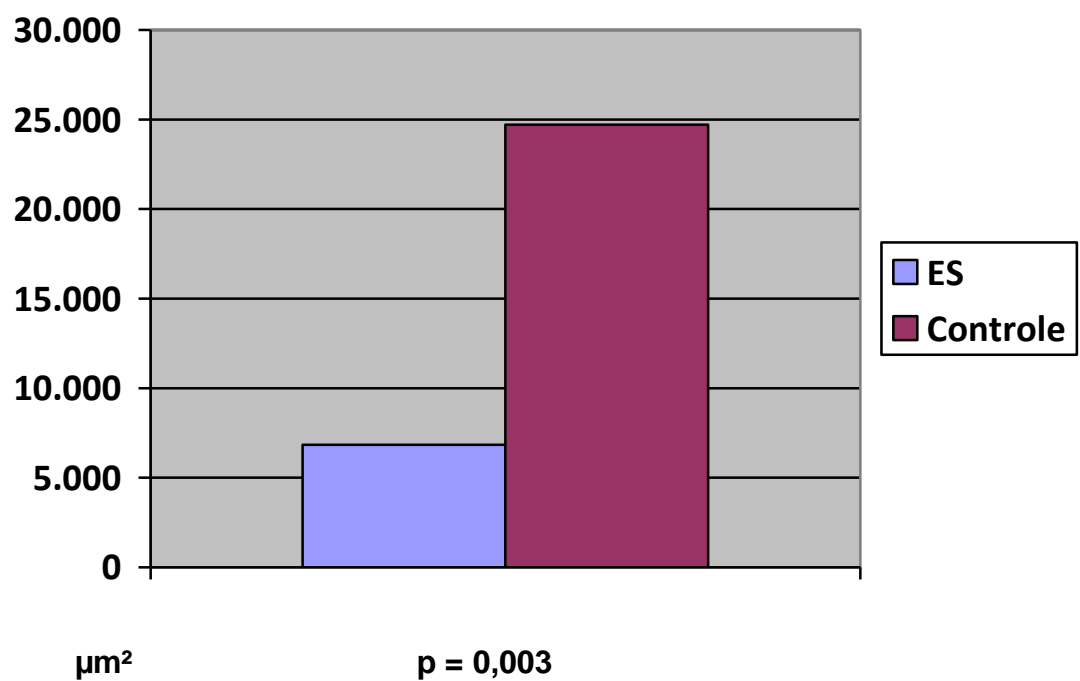
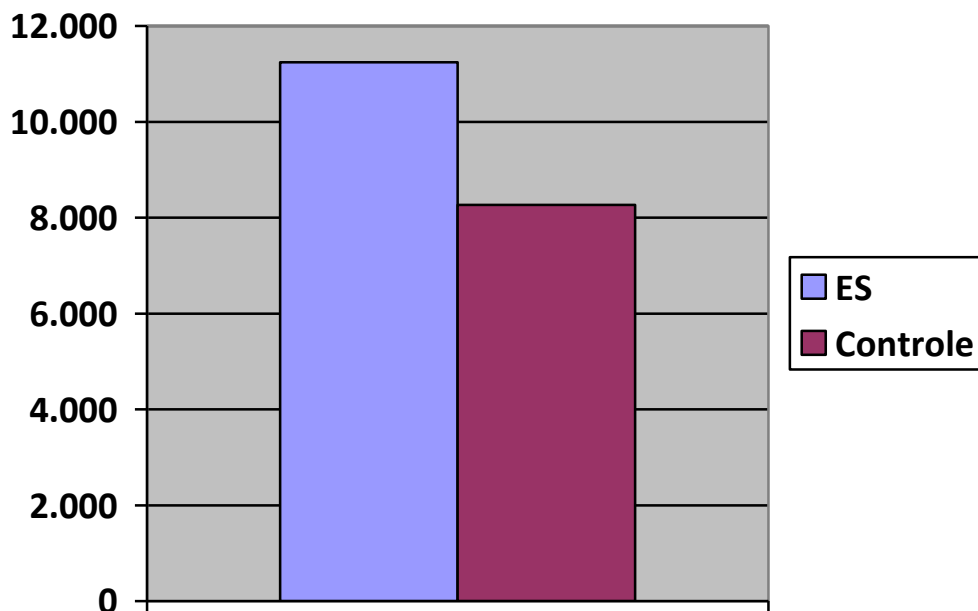
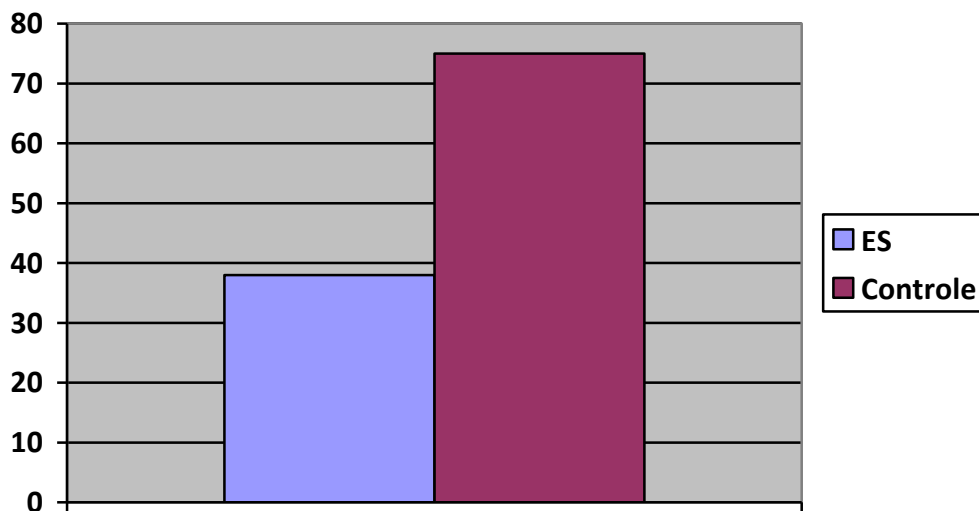


Gráfico 3. ATV - AL dos grupos ES e Controle (em μm^2) μm^2 $p = 0,048$ **Gráfico 4. AL/ATV x 100 dos grupos ES e Controle (em %)**

%

 $p < 0,0001$

Tabela 7. Resultado das contagens da expressão de ICAM nos vasos do grupo ES.

LÂMINA	CAMPO	VASO	POSITIVO	NEGATIVO
1-5906580B	1	1	2	0
		2	2	0
	2	1	2	0
		2	0	1
	3	1	3	2
	4	1	0	2
	5	1	4	2
	6	1	2	3
	7	1	1	1
		2	2	0
	8	1	0	3
	9	1	4	0
	2	2	1	0
	10	1	0	2
2-5171644C	1	1	2	0
		2	0	1
	2	1	1	1
	3	1	2	0
	4	1	2	0
	5	1	5	1
	6	1	1	1
	7	1	2	0
	8	1	1	0
	9	1	2	0
	10	1	2	3
3-5580200B	1	1	1	1
	2	1	5	0
	3	1	1	2
	4	1	2	0
	5	1	2	2
	6	1	6	1
	7	1	3	0
	8	1	1	1
	9	1	2	0
		10	1	2
4-4983700D	1	1	5	0
	2	1	3	1
	3	1	2	2
	4	1	2	1
	5	1	3	0
	6	1	5	0
	7	1	2	1
	8	1	1	3
	9	1	4	2
		10	1	2

Continuação tabela 7

LÂMINA	CAMPO	VASO	POSITIVO	NEGATIVO
5-5054133C	1	1	3	1
	2	1	3	3
	3	1	3	0
	4	1	3	1
	5	1	4	1
	6	1	4	0
	7	1	3	0
	8	1	2	2
	9	1	4	3
	10	1	4	1
6-6131743B	1	1	3	2
	2	1	3	1
	3	1	3	1
		2	1	0
	4	1	1	1
		2	3	0
	5	1	3	0
	6	1	3	0
		2	1	1
	7	1	1	2
8	1	4	0	
	2	2	0	
9	1	3	0	
	2	1	1	
	3	1	0	
	10	1	0	2
7-5754666D	1	1	2	1
	2	1	4	2
	3	1	3	2
	4	1	3	1
	5	1	2	1
	6	1	3	1
	7	1	3	1
	8	1	2	1
	9	1	3	0
		2	0	1
	10	1	4	1
		2	4	2
total	70 campos	83 vasos	196	80

Pontos para ICAM dos vasos dos pacientes com ES:

$(Pi \times 100) / PVASOS = 196 \times 100 / 276 = 71\%$ de positividade

Tabela 8. Resultado das contagens da expressão de ICAM nos vasos do grupo controle.

LÂMINA	CAMPO	VASO	POSITIVO	NEGATIVO	
Controle 1	1	1	0	4	
	2	1	0	4	
	3	1	0	3	
	4	1	0	4	
	5	1	0	4	
	6	1	1	4	
	7	1	0	3	
	8	1	1	4	
	9	1	0	4	
	10	1	0	3	
Controle 2	1	1	1	3	
	2	1	1	3	
	3	1	0	4	
	4	1	1	2	
	5	1	1	4	
	6	1	1	3	
	7	1	1	2	
			2	1	2
			3	1	3
	8	1	0	2	
			2	0	3
			3	1	3
	9	1	0	3	
			2	1	1
	10	1	0	3	
			2	0	3
	total	20 campos	26 vasos	12	81

Ppontos para ICAM dos vasos do grupo controle:

$(P_i \times 100) / P_{VASOS} = 12 \times 100 / 93 = 12,9 \%$ de positividade

Teste exato de Fisher para positividade de ICAM : ES x controles

	Positivos	Negativos	Total
Controle	12	81	93
ES	196	80	276
Total	208	161	369

P < 0,0001

Tabela 9. Resultado das contagens da expressão de VCAM nos vasos do grupo ES.

LÂMINA	CAMPO	VASO	POSITIVO	NEGATIVO	
1-4983700	1	1	0	2	
	2	1	0	3	
	3	1	0	4	
	4	1	0	3	
			2	0	1
	5	1	0	2	
	6	1	0	2	
	7	1	0	3	
			2	0	2
	8	1	0	3	
		2	0	1	
	9	1	0	1	
		2	0	2	
	10	1	0	4	
2-5906580	1	1	1	1	
	2	1	0	2	
			2	1	1
	3	1	1	1	
	4	1	0	2	
	5	1	1	2	
	6	1	1	2	
			2	2	1
	7	1	1	3	
	8	1	0	1	
	9	1	2	1	
	10	1	0	2	
3-5054133	1	1	0	1	
	2	1	0	1	
			2	0	1
	3	1	0	1	
	4	1	2	2	
	5	1	1	2	
	6	1	0	1	
			2	0	1
	7	1	0	1	
	8	1	0	2	
		2	0	1	
		3	0	1	
	9	1	0	3	
	10	1	0	2	

Continuação Tabela 9

LÂMINA	CAMPO	VASO	POSITIVO	NEGATIVO
4-5171644	1	1	2	0
	2	1	0	2
		2	0	1
	3	1	1	0
		2	0	1
	4	1	0	1
		2	0	1
	5	1	4	0
	6	1	0	2
	7	1	1	0
	2	0	1	
		3	0	1
	8	1	1	1
	9	1	1	1
		2	1	0
	10	1	0	2
5-5580200	1	1	2	1
		2	1	1
	2	1	1	3
	3	1	1	1
	4	1	2	1
	5	1	2	2
	6	1	1	1
	7	1	0	1
		2	0	1
	8	1	1	0
	2	0	1	
		3	0	1
	9	1	1	1
	10	1	0	2
6-5754666	1	1	2	3
	2	1	1	2
	3	1	5	0
	4	1	2	2
	5	1	1	2
	6	1	2	1
	7	1	3	1
	8	1	2	3
	9	1	3	0
	10	1	3	0

Continuação tabela 9

7-6131743	1	1	2	1
		2	2	2
	2	1	2	2
	3	1	2	1
	4	1	1	2
	5	1	5	1
	6	1	0	3
	7	1	1	3
	8	1	2	2
	9	1	4	1
	10	1	2	1
total	70 campos	91 vasos	83	136

Pontos para VCAM dos vasos dos pacientes com ES:

$(\text{Pi} \times 100) / \text{PVASOS} = 83 \times 100 / 219 = 37,89\% \text{ de positividade}$

Tabela 10. Resultado das contagens da expressão de VCAM nos vasos do grupo controle.

LÂMINA	CAMPO	VASO	POSITIVO	NEGATIVO
Controle 1	1	1	0	3
	2	1	1	2
	3	1	0	2
	4	1	1	2
	5	1	0	4
	6	1	0	3
	7	1	0	4
		2	0	1
	8	1	1	3
	9	1	0	3
	10	1	0	3
		2	1	1
Controle 2	1	1	0	3
	2	1	3	2
	3	1	0	3
		2	1	3
	4	1	2	2
	5	1	0	4
		2	0	5
	6	1	1	3
	7	1	0	6
	8	1	0	3
		2	0	2
	9	1	1	1
		2	1	3
	10	1	2	5
total	20 campos	26 vasos	15	76

Pontos para VCAM dos vasos dos controles:

$(P_i \times 100) / P_{VASOS} = 15 \times 100 / 91 = 16,48 \%$ de positividade

Teste exato de Fisher para positividade de VCAM : ES x controles

	Positivos	Negativos	Total
Controle	15	76	91
ES	83	136	219
Total	98	212	310

P= 0,0002

7. DISCUSSÃO

7.1 Análise da microscopia confocal das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre na Esclerose Sistêmica.

Este estudo demonstrou, através da análise pela microscopia confocal a laser das artérias de pequeno e médio calibre de pacientes portadores de ES, que estas artérias são menores quando comparadas a controles normais. Observamos também que a área do lúmen das artérias pulmonares na ES é significativamente menor quando comparada ao controle, sugerindo que estes vasos estão menores, estreitados e com suas paredes espessadas, fato último comprovado pela diferença entre as áreas totais dos vasos e as respectivas áreas de seus lúmens significativamente maiores nos portadores de ES comparado aos controles normais.

Finalmente, a relação área do lúmen do vaso dividida pela área total do vaso x 100 foi significativamente menor no grupo ES em comparação ao controle, reforçando a idéia de que as artérias pulmonares de pequeno e médio calibre estão estreitadas e com seu lúmen diminuído nos portadores de ES. Outro achado importante e interessante deste nosso estudo foi a grande variação observada na área do lúmen das artérias pulmonares do grupo ES em relação ao observado no grupo controle, mostrando que estas artérias estão heterogeneamente afetadas nos portadores de ES, e que provavelmente representam diferentes estádios de acometimento da doença na vasculatura pulmonar.

Esta análise da microestrutura das artérias pulmonares através da microscopia confocal a laser é inédita na literatura médica, sendo

encontradas somente referências de análise de vasos da pele em portadores de ES (75,76).

A análise da vasculatura pulmonar com o microscópio confocal já foi realizada em outro estudo em nosso serviço, porém com outra doença pulmonar: a Granulomatose de Wegener (77,78) que constatou espessamento da parede das artérias de pequeno e médio calibre e diminuição da área do lúmen do vaso com maior prevalência de trombose intraluminal que nos controles.

Na literatura médica encontramos apenas um estudo caso-controle com análise histológica e morfométrica das artérias pulmonares de 58 pacientes portadores de ES submetidos a autópsia. Foi constatado no grupo ES aumento da área da camada íntima e de vasos com oclusão da luz, nos vasos de grande e médio calibre essa diferença teve significância estatística (80).

7.2 Análise imunohistoquímica da expressão de I-CAM e V-CAM das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre na Esclerose Sistêmica.

Nossos achados como o aumento significativo da expressão de I-CAM e V-CAM no endotélio de pacientes portadores de ES comparados aos controles normais indicam a ocorrência de ativação endotelial das artérias pulmonares em pacientes com acometimento pulmonar pela doença.

A ativação das células endoteliais leva a: disfunção celular, expressão de moléculas de adesão, recrutamento leucocitário, adesão e ativação plaquetária e infiltração perivascular com exsudato. A camada íntima do vaso se torna espessa, devido à proliferação local dos miofibroblastos, que foram estimulados pelos fatores de crescimento tecidual, stress oxidativo e imunomediadores. Normalmente o aumento da camada íntima causa a redução do lumen do vaso, o que diminui o fluxo sanguíneo local. Outros fatores que podem contribuir para o estreitamento da luz do vaso é o desequilíbrio entre a coagulação, que encontra-se hiperestimulada, e a fibrinólise reduzida. A disfunção endotelial gera um aumento dos fatores vasoconstritores, como a endotelina-1, e redução dos vasodilatadores: óxido nítrico (NO) e prostaciclina. Há uma diminuição da sensibilidade dos nervos sensoriais aos peptídeos dilatadores, e os adrenoreceptores α_2c ($\alpha_2c - AR$) da musculatura lisa vascular ficam mais sensíveis ao estímulo vasoconstritor do frio e do stress. Episódios consecutivos de vasoespasmo intenso levam a oclusão da microcirculação com lesão tecidual pela isquemia-reperfusão

constante e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (67). Nosso estudo corrobora com a hipótese de ativação endotelial das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre nos portadores de ES com acometimento pulmonar da doença pela comprovação do aumento da expressão endotelial de ICAM e VCAM comparado aos controles normais. Desde os primeiros experimentos observando a interação morfológica do endotélio com constituintes do sangue, muito se avançou na compreensão sobre a função endotelial na comunicação entre o componente sanguíneo e tecidual durante o estímulo inflamatório. O endotélio se modifica como consequência de lesão ou situações patológicas através da expressão de moléculas de adesão que por sua vez irão modular a interação do endotélio com células do sangue. A interação entre leucócitos e endotélio no local de inflamação é chamada cascata de ativação leucocitária e pode ser dividida de maneira simplificada em: rolamento leucocitário sobre endotélio, adesão e migração através das células endoteliais para os tecidos. Na microvasculatura sistêmica, o estímulo inflamatório leva a ativação endotelial com maior exposição de receptores de membrana responsáveis pela marginação de leucócitos e rolamento lento por sobre o endotélio. Esses receptores de membrana são as E-Selectinas e P-Selectinas e são expressas em células endoteliais em situações de inflamação. Os leucócitos se ligam às selectinas do endotélio através de receptores de membrana específicos nos leucócitos, *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) e *E-selectin ligand-1* (ESL-1), e essa interação determina um rolamento lento do leucócito por sobre o endotélio, expondo-o ao microambiente e seus

estímulos inflamatórios. Esses estímulos inflamatórios ativam as integrinas nos leucócitos ($\beta 2, \alpha 4$) aumentando sua afinidade e atividade. A ativação das integrinas permitirá sua ligação com moléculas da superfamília das imunoglobulinas (V-CAM-1, I-CAM-1, I-CAM-2) expressas nas células endoteliais promovendo assim a firme adesão dos leucócitos ao endotélio. A I-CAM-1 é expressa de maneira constitutiva nas células endoteliais, mas tem sua expressão significativamente aumentada mediante estímulo inflamatório. Já a V-CAM-1 só se expressa na superfície endotelial mediante estímulos como TNF, endotoxina e interleucina-1 (IL-1). O processo de migração leucocitária através do endotélio é o último passo da cascata de ativação leucocitária e ocorre primariamente nas junções entre células (transmigração paracelular) sem distorção da estrutura vascular. Caso o leucócito tenha aderido ao endotélio em uma região distante do espaço paracelular de migração, é necessário que ocorra o *crawling* – deslocamento lento aderido ao endotélio mediado por ICAM-1 e MAC1 (CD11b) até o local adequado de migração transcelular. Moléculas específicas como a PECAM-1 estão localizadas nas junções celulares e mediam ativamente a passagem dos leucócitos para os tecidos. Outra rota de transmigração menos comum é diretamente através da célula endotelial, chamada de transmigração celular de mecanismo menos extensamente estudado mas envolvendo as mesmas moléculas como a ICAM-1 (71).

7.3 Estudos prévios dos vasos na Esclerose Sistêmica

Em estudos prévios sobre a ES foram feitas análises histológicas de órgãos alvo e observou-se uma vasculopatia característica da doença, com espessamento da camada íntima seguida por fibrose, camada média discretamente anormal, e leve hipertrofia da musculatura lisa (67).

O mediador exato da ativação celular é desconhecido, mas suspeita-se de substâncias liberadas pela ativação endotelial como a endotelina-1 (ET-1), e pelas plaquetas como tromboxane ou fator de crescimento plaquetário.

O endotélio é um órgão em atividade contínua que regula fenômenos como coagulação, fibrinólise, e migração celular, através da produção de vasodilatadores (óxido nítrico e prostaciclina), vasoconstritores (ET-1 e fator de ativação plaquetária) e moléculas de adesão celular (selectinas e integrinas) (71). Ultimamente tem-se avaliado o endotélio vascular principalmente das patologias auto-imunes, pois acredita-se que a alteração endotelial possa ter papel fundamental na fisiopatologia dessas doenças.

Estudos que usaram a microscopia eletrônica para análise de biópsia de pele mostraram espessamento da camada basal dos capilares, células endoteliais com núcleos redondos ou ovais, edema das mitocôndrias, e citoplasma preenchido com filamentos, todos achados que sugerem dano celular (72). O lumen dos vasos estava reduzido devido a acúmulo de células endoteliais, plaquetas e grânulos.

Outros trabalhos mostraram que na microscopia convencional nem sempre é possível observar lesão das células endoteliais, mas naqueles que

evidenciaram mudanças, alguns achados foram compatíveis com apoptose celular, como aumento do número de filamentos citoplasmáticos, redução da quantidade de vesículas e *blebs* na superfície luminal (73,74).

7.4 Esclerose Sistêmica e Hipertensão Arterial Pulmonar

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é a causa isolada mais comum de morte em pacientes com ES. Apesar dos avanços nos últimos 20 anos quanto ao esclarecimento da fisiopatologia e de novas terapias para a HAP, quando há a associação HAP e ES a resposta à terapia é pobre (66). Não se sabe ainda a razão para essa diferença na evolução clínica e no prognóstico, mas alguns estudos sugerem que na ES há uma resposta inflamatória e celular mais intensa devido ao fator da autoimunidade, além da presença de comorbidades como doença intersticial ou venosa pulmonar e cardiopatias.

Será de grande valia o conhecimento maior sobre a fisiopatologia e fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento da HAP nos portadores de ES, pois a partir daí surgirão meios mais precisos para avaliar a evolução e resposta da doença à terapia, bem como novos tratamentos mais eficazes (82).

7.5 Estudos realizados na Faculdade de Medicina da USP

Alguns estudos em pacientes portadores de Esclerose Sistêmica realizados pelo departamento de patologia da Faculdade de Medicina da USP, encontraram um índice de apoptose elevado nas células endoteliais de pacientes com ES comparado ao controle, além de ruptura da membrana basal do vaso pulmonar e aumento do colágeno tipo V na parede do vaso destes pacientes, reforçando a importância da injúria vascular como fisiopatologia da doença (82).

Outro estudo comparou biópsias pulmonares com resultado de pneumonia intersticial não específica (NSIP) de etiologia idiopática com as secundárias à ES, e observou uma redução maior na densidade de células epiteliais e de microvasos no grupo ES, além de maior atividade vascular medido pela expressão de VCAM. Esses achados sugeriram fisiopatologias diferentes causando o mesmo padrão patológico pulmonar, além de novamente ressaltar as alterações vasculares proeminentes na ES (83,84).

7.6 Considerações sobre o estudo atual

O estudo atual conseguiu obter através da microscopia confocal e da imunohistoquímica a confirmação de alteração vascular importante presente em todas as pacientes portadoras de ES submetidas à biópsia pulmonar. No entanto, ainda não conseguimos definir causas para a evolução pior dos pacientes com ES que desenvolvem HAP, o que sugere novas pesquisas comparando histologicamente pacientes com ES e com HAP idiopática.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as artérias dos pacientes com ES apresentam redução do seu lúmen, o que nos leva à conclusão de que suas paredes principalmente o endotélio encontram-se mais espessas, favorecendo a hipótese de lesão e ativação endotelial das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre na ES.

Obtivemos a confirmação através da análise estatística dos dados, a área do lúmen no grupo ES é significativamente menor do que no grupo controle, indicando um aumento da espessura das camadas, inclusive do endotélio, diminuindo a luz do vaso. Além disso, a área total do vaso menos a área do lúmen também teve diferença significativa entre os grupos.

A maior diferença ocorreu na relação área do lúmen/área total do vaso x 100, mostrando que realmente há espessamento da parede das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre na ES. Finalmente, ocorre aumento da expressão de I-CAM e V-CAM no endotélio das artérias pulmonares de pequeno e médio calibre de pacientes portadores de ES comparado aos controles.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Varga J. Systemic sclerosis: an uptodate.
Bull NYU Hosp Jt Dis. 2008; 66(3):198-202. Review.
2. Karassa FB, Ioannidis JP. Mortality in systemic sclerosis.
Clin Exp Rheumatol. 2008 Sep-Oct; 26(5 Suppl 51):85-93.
3. Rodnan GP, Benedek TG. A historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma).
Ann Intern Med. 1962; 57:305-319.
4. Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis.
Autoimmun Rev. 2010 Mar; 9(5):311-318.
5. Silman AJ. Scleroderma - Demographics and survival. J Rheumatol
1997;24:58-61.
6. Steen VD, Medsger TA Jr. Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. Rheum Dis Clin North Am 1990;16:1-10.
7. Silman AJ, Jannini S, Symmons D, Bacon P. An epidemiological study of scleroderma in the West Midlands. Br J Rheumatol 1988;27:286-290.

8. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE. Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum* 1989;32:998-1006.

9. Altman RD, Medsger TA Jr, Bloch DA, Beat AM. Predictors of survival in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1991;34:403-413.

10. Mora GF. Systemic sclerosis: environmental factors. *J Rheumatol* 2009 Nov;36(11):2383-96.

11. Black CM. Scleroderma clinical aspects. *J Intern Med* 1993; 234:115-118.

12. Falanga V, Medsger TA Jr, Reichlin M, Rodnan GP. Linear scleroderma. Clinical spectrum and laboratory abnormalities. *Ann Intern Med* 1986; 104:849-855.

13. Laxer RM, Zulian F. Localized scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 606-610.

14. Falanga V. Localized scleroderma. *Med Clin North AM* 1989; 73:1143-56.

15. Lonzetti LS, Joyal F, Raynauld JP, Et al. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis:

addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001; 44:735-6.

16. Hayakawa I, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Anti-DNA topoisomerase II alpha autoantibodies in localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50:227-232.

17. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:581-590.

18. Molina JF, Anaya JM, Cabrera GE, et al. Systemic sclerosis sine scleroderma: An unusual presentation in scleroderma renal crisis. *J Rheumatol* 1995; 22:557-560.

19. Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA Jr. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serological features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2000; 43:444-451.

20. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15:202-205.

21. Silman AJ. Scleroderma. *Baillieres Clin Rheumatol* 1995; 9:471-482.
22. Fitzgerald O, Hess EV, O'Connor GT, Spencer-Green G. Prospective study of the evolution of Raynaud's phenomenon. *Am J Med* 1988; 84:718-726.
23. Clements PJ, Lachenbruch PA, Seibold JR, Zee B, Steen VD, Brennan P *et al*. Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J Rheumatol* 1993;20(11):1892-6.
24. Suter LG, Murabito JM, Felson DT, Fraenkel L. The incidence and a natural history of Raynaud's phenomenon in the community. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1259-63.
25. Hachulla E, Clerson P, Launay D, Lambert M, Morell-Dubois S, Queyrel V *et al*. Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. *J Rheumatol* 2007;34:2423-30.
26. Nihtyanova SI, Brough GM, Black CM, Denton CP. Clinical burden of digital vasculopathy in limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:120-123.

27. Wigley FM. Vascular disease in scleroderma. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009;36: 150-175.
28. Meli M, Gitzelmann G, Koppensteiner R, mann-Vesti BR. Predictive value of nailfold capillaroscopy in patients with Raynaud's phenomenon. *Clin Rheumatol* 2006;25:153-158.
29. Grassi W, De AR. Capillaroscopy: question and answers. *Clin Rheumatol* 2007;26:2009-16.
30. Maricq HR, LeRoy EC, D'Angelo WA, Medsger TA Jr, Rodnan GP, Sharp GC et al. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980;23:183-189.
31. Walker JG, Stirling J, Beroukas D, Dharmapatni K, Haynes DR, Smith MD et al. Histopathological and ultrastructural features of dermal telangiectasias in systemic sclerosis. *Pathology* 2005;37:220-225.
32. Fujimoto M, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Komura K, Matsushita T, Yanaba K et al. A clue for telangiectasias in systemic sclerosis: elevated serum soluble endoglin levels in patients with limited cutaneous form of the disease. *Dermatology* 2006;213:88-92.

33. Penn H, Howie AJ, Kingdon EJ, Bunn CC, Stratton RJ, Black CM et al. Scleroderma renal crisis: patients characteristics and long-term outcomes. *QJM* 2007;100:485-494.
34. Sjogren RW. Gastrointestinal motility disorders in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1994;37:1265-82.
35. Follansbee WP, Curtiss EI, Medsger TA Jr, Steen VD, Uretsky BF, Owens GR et al. Physiologic abnormalities of cardiac function in progressive systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *N Engl J Med* 1984;310:142-148.
36. Alexander EL, Firestein GS, Weiss JL, Heuser RR, Leidl G, Wagner N Jr et al. Reversible cold-induced abnormalities in myocardial perfusion and function in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1986;105:661-668.
37. Nehra A, Hall SJ, Basile G, Bertero EB, Moreland R, Toselli P et al. Systemic sclerosis and impotence: a clinicopathological correlation. *J Urol* 1995;153:1140-46.
38. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007;66:940-944.

39. Janosik DL, Osborn TG, Moore TL et al. Heart disease in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 1989;19:191-196.
40. Roberts NK, Cabeen WR, Moss J, Clements PJ, Furst DE. The prevalence of conduction defects and cardiac arrhythmias in progressive systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1981;94:38-40.
41. Tzelepis GE, Kelekis NL, Plastiras SC et al. Pattern and distribution of myocardial fibrosis in systemic sclerosis: a delayed enhanced magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum* 2007; 56:3827-33.
42. Medsger TA Jr, Masi AT, Rodnan GP et al. Survival with systemic sclerosis (scleroderma). A life-table analysis of clinical and demographic factors in 309 patients. *Ann Intern Med* 1971; 75:369-378.
43. Livi R, Teghini L, Pignone A et al. Renal functional reserve is impaired in patients with systemic sclerosis without clinical signs of kidney involvement. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:682-689.
44. Steen VD, Constantino JP, Shapiro AP, Medsger TA Jr. Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation of availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Ann Intern Med* 1990; 113: 352-357.
45. Helfrich DJ, Banner B, Steen VD, Medsger TA Jr. Normotensive renal failure in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1128-34.

46. Lock G, Holstege A, Lang B, Schölmerich J. Gastrointestinal manifestations of progressive systemic sclerosis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 763-771.
47. Johnson DA, Drane WE, Curran J et al. Pulmonary disease in progressive systemic sclerosis: a complication of gastroesophageal reflux and occult aspiration? *Arch Intern Med* 1989; 149: 589-593.
48. Zamos B, Hirschberg J, Ippoliti AF, Furst DE, Clements PJ, Weinstein WM. Esophagitis in scleroderma. *Gastroenterology* 1987; 92: 421-428.
49. Averbuch-Heller L, Steiner I, Abramsky O. Neurologic manifestations of progressive systemic sclerosis. *Arch Neurol* 1992; 49: 1292-95.
50. Simeon CP, Armadans L, Fonollosa V, Solans R, Selva A, Villar M, Lima J, Vaque J, Vilardell M. Mortality and prognostic factors in Spanish patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:71–75.
51. Fujita J, Yoshinouchi T, Ohtuski Y, et al. Non-specific interstitial pneumonia as pulmonary involvement of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:281-283.
52. Highland KB, Heffner JE. Pleural effusion in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2004; 10: 390-396.
53. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients

with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1581-6.

54. Allanore Y, Borderie D, Lemarechal H, Ekindjian OG, Kaha NA. Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis. *Am J Med* 2004; 116: 595-600.

55. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA Jr. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1994;37:1283–9.

56. Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Nikolakopoulou A, Goh NS, Nicholson AG, et al. CT features of lung disease in patients with systemic sclerosis: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia. *Radiology* 2004; 232: 560-567.

57. Wells AU, Hansell DM, Rubens MB, et al. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis. Indices of lung function in relation to extent of disease on computed tomography. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1229-37.

58. Steen VD, Medsger TA Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2437-44.

59. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society,

Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation*.

2009;119:2250–94.

60. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, et al. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3792–3800.

61. Badesch DB, Benza RL, Krichman AM, Raskob GE, Giles S. REVEAL Registry: Baseline characteristics of the first 1,226 enrolled patients. *Chest* 2007;132:473S.

62. Steen VD, Medsger TA Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003; 48:516-522.

63. Mukherjee D, George D, Knight C, et al. Echocardiography and pulmonary function as screening tests for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43:461-6

64. Kawut SM, Taichman DB, Archer-Chicko CL, Palevsky HI, Kimmel SE. Hemodynamics and survival in patients with pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis. *Chest*. 2003;123:344–350.

65. Williams MH, Handler CE, Akram R, et al. Role of N-terminal brain natriuretic peptide (N-TproBNP) in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2006;27:1485–1494.

66. Le Pavec J, Humbert M, Mouthon L, Hassoun PM. Systemic sclerosis – associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:1285-93.
67. Wigley FM. Vascular disease in scleroderma. *Clin Rev Allerg Immunol* 2009; 36:150-175.
68. Estudo da trombose microvascular em biópsias pulmonares de pacientes com granulomatose de Wegener. Tese de Doutorado de Alfredo Nicodemos da Cruz Santana. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.
69. www.zeiss.com/micro - downloads for LSM - Image Browser.
70. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96(5): 379-94.
71. Szucs G, Timar O, Szekanecz Z, Der H, Kerekes G, Szamosi S et al. Endothelial dysfunction precedes atherosclerosis in systemic sclerosis – relevance for prevention of vascular complications. *Rheumatology* 2007; 46:759-762.
72. Trotta F, Biagini G, Cenacchi G, Ballardini G, Varotti C, Passarini B et al. Microvascular changes in progressive systemic sclerosis:

immunohistochemical and ultrastructural study. *Clin Exp Rheumatol* 1984; 2:209-215.

73. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992; 166:255-263.

74. Freemont AJ, Hoyland J, Fielding P, Hodson N, Jayson MI. Studies of the microvascular endothelium in uninvolved skin of patients with systemic sclerosis: direct evidence for a generalized microangiopathy. *Br J Dermatol* 1992; 126:561-568.

75. Margheri F, Manetti M, Serrati S, Nosi D, Pucci M, Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Bazzichi L, Fibbi G, Ibba-Manneschi L, Del Rosso M. Domain 1 of the urokinase-type plasminogen activator receptor is required for its morphologic and functional, beta2 integrin-mediated connection with actin cytoskeleton in human microvascular endothelial cells: failure of association in systemic sclerosis endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54(12): 3926-38.

76. Sauermann K, Hoffmann K. Histometric data obtained by in vivo confocal laser scanning microscopy in patients with systemic sclerosis. *BMC Dermatol* 2002; 6: 2-8.

77. Borges ER, Santana AN, Parra ER, Ab'Saber AM, Antunes T, Nunes FS, Chaves MJF, Capelozzi VL, Barbas CSV. Confocal microscopy visualization

of internal elastic fibers destruction and intraluminal thrombosis in Wegener Granulomatosis [resumo]. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 169(7): A153.

78. Santana AN, Ab'Saber AM, Borges ER, Antunes T, Barros JM, Capelozzi VL, Barbas CSV. Confocal microscopic analysis of pulmonary arterial thrombosis in Wegener Granulomatosis [resumo]. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: A412.

79. Santana AN, Borges ER, Antunes T, Barros JM, Kairalla RA, Carvalho CRR, Barbas CSV. Ninety one patients with Wegener Granulomatosis (resumo). *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: A366.

80. al-Sabbagh MR, Steen VD, Zee BC, Nalesnik M, Trostle DC, Bedetti CD, Medsger TA Jr. Pulmonary arterial histology and morphometry in systemic sclerosis: a case-control autopsy study. *J Rheumatol* 1989; 16(8): 1038-42.

81. McLaughlin V, Humbert M, Coghlan G, Nash P, Steen V. Pulmonary arterial hypertension: the most devastating vascular complication of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48 Suppl 3:iii25-31.

82. Parra ER, Aguiar AC Jr, Teodoro WR, de Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir Journal* 2009; 3(3): 135-42.

83. de Carvalho EF, Parra ER, de Souza R, Ab'Saber AM, Capelozzi VL. Parenchymal and vascular interactions in the pathogenesis of nonspecific

interstitial pneumonia in systemic sclerosis and idiopathic interstitial pneumonia. *Respiration* 2008; 76(2):146-53.

84. de Carvalho EF, Parra ER, de Souza R, Ab'Saber AM, Machado J de C, Capelozzi VL. Arterial and interstitial remodelling processes in non-specific interstitial pneumonia: systemic sclerosis versus idiopathic. *Histopathology* 2008; 53(2): 195-204.