

Leticia Barbosa Kawano Dourado

**Ativação endotelial na granulomatose com poliangeíte
(granulomatose de Wegener)**

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

Programa de Pneumologia

Orientadora: Prof. Dra. Carmen Sílvia Valente
Barbas

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dourado, Letícia Barbosa Kawano

Ativação endotelial na granulomatose com poliangéite (granulomatose de Wegener) / Letícia Barbosa Kawano Dourado. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Pneumologia.

Orientadora: Carmen Sílvia Valente Barbas.

Descritores: 1. Granulomatose de Wegener 2. Granulomatose com poliangéite 3. Molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) 4. Molécula 1 de adesão de célula vascular (VCAM-1) 5.Selectina-E 6. Endotélio vascular 7. Moléculas de adesão celular

USP/FM/DBD-026/15

Para

Daniel e Inácio

E para Conceição (*in memoriam*) e Yoshihisá

Agradecimentos

À minha orientadora, prof. Dra. Carmen Sílvia Valente Barbas, pelo suporte na elaboração deste e de outros trabalhos, pela amizade, e pelos inúmeros ensinamentos na arte de exercer a medicina.

À prof. Dra. Vera Capelozzi, Dr. Alexandre M Ab`Saber, prof. Dr. Ronaldo Adib Kairalla, prof. Dr. Rimarcs Gomes Ferreira, Dr. Bruno Guedes Baldi, Dra. Maristela Rangel, Dra. Carla Valeri pelas valiosas contribuições dadas a este trabalho.

À Esmeralda Miristeni Eher e a Sandra de Moraes Fernezlian pela ajuda com técnica imunohistoquímica.

Ao departamento de Cardiopneumologia, disciplina de pneumologia, pelo suporte institucional.

Aos amigos do grupo de doenças intersticiais pulmonares pela engrandecedora convivência.

Aos meus pais, Conceição e Yoshihisá, e à minha irmã, Débora, pelo apoio e pelo incentivo desde sempre.

A Daniel e Inácio, por compartilharem comigo este e todos os outros projetos, pela cumplicidade na aventura de viver.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

- Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.
- 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.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de siglas

Resumo

Abstract

| | |
|---|----|
| 1. Introdução----- | 01 |
| 1.1 Considerações iniciais----- | 02 |
| 1.2 Patogênese da granulomatose com poliangeíte----- | 05 |
| 1.2.1 Evento inflamatório inicial e fatores de risco----- | 05 |
| 1.2.2 Papel patogênico do ANCA----- | 06 |
| 1.2.3 Papel do endotélio na granulomatose com poliangeíte----- | 08 |
| 1.3 Moléculas de adesão celular----- | 11 |
| 1.3.1 Moléculas de adesão celular na granulomatose com poliangeíte----- | 11 |
| 2. Hipótese do estudo----- | 13 |
| 3. Objetivos----- | 15 |
| 4. Métodos----- | 17 |
| 4.1 Desenho do estudo----- | 18 |
| 4.2 Amostras estudadas----- | 18 |
| 4.2.1 Amostras de casos de granulomatose com poliangeíte----- | 18 |
| 4.2.2 Amostra de casos de esclerodermia----- | 18 |
| 4.2.3 Amostra de casos de controles normais----- | 19 |
| 4.3 Análise das amostras----- | 19 |
| 4.3.1 Caracterização morfológica----- | 19 |
| 4.3.2 Preparo das amostras e técnica imuno-histoquímica----- | 20 |
| 4.3.3 Determinação dos índices imuno-histoquímicos----- | 21 |
| 4.4 Análise estatística----- | 23 |

| | |
|---|----|
| 5. Resultados----- | 24 |
| 5.1 Casos de granulomatose com poliangéite incluídos na análise----- | 25 |
| 5.2 Características clínicas da amostras estudadas----- | 25 |
| 5.3 Expressão de marcadores de ativação endotelial----- | 28 |
| 6. Discussão----- | 33 |
| 6.1 Caracterização do material utilizado----- | 34 |
| 6.2 Considerações sobre a técnica imuno-histoquímica ----- | 35 |
| 6.3 Diferenças no perfil de expressão de marcadores de adesão celular entre granulomatose com poliangéite e esclerodermia----- | 37 |
| 6.4 Considerações finais----- | 38 |
| 7. Conclusão----- | 40 |
| 8. Anexo----- | 42 |
| 9. Referências----- | 47 |

Lista de Abreviaturas

Dr: Doutor

Dra: Doutora

Dx: diagnóstico

ex: exemplo

N: número

pctes: pacientes

Prof: Professora(o)

SScl: systemic sclerosis (Esclerodermia)

Lista de Siglas

ACR: *American College of Rheumatology*

ANCA: Anticorpo anticitoplasma de neutrófilos

BOOP: bronquiolite obliterante e pneumonia em organização

ESL-1: *E-selectin ligand-1*

FMUSP: Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo

GPA: granulomatose com poliangeíte

HC: Hospital das Clínicas

HE: Hematoxilina e eosina

hLAMP-2: anti-proteína-2 de membrana lisossomal humana

HUVECs: *human umbilical vein endothelial cells*

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IL-1: interleucina 1

IL-4: interleucina 4

InCor: Instituto do Coração

IQR: intervalo interquartil

MESH: *Medical Subject Headings*

MPO: mieloperoxidase

PINE: pneumonia intersticial não específica

PR3: proteinase 3

PSGL-1: *P-selectin glycoprotein ligand-1*

TNF: fator de necrose tumoral

VCAM-1: molécula de adesão vascular 1

VF: vidro fosco

RESUMO

Dourado LBK. *Ativação endotelial na granulomatose com poliangeíte* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO:

Eventos vasculares e imunológicos são centrais na patogênese da granulomatose com poliangeíte (GPA). Moléculas de adesão celular tem papel fundamental no recrutamento de células inflamatórias do sangue para os tecidos. Diferentes leitos vasculares apresentam particularidades na expressão de moléculas de adesão celular explicando talvez parte da especificidade da GPA por determinados órgãos. A elevação no nível sérico de moléculas de adesão celular e aumento da expressão destas em amostras de biópsia renal já foram demonstrados em pacientes com vasculite ANCA associada. No entanto, o fenômeno ainda não foi estudado *in situ* no pulmão.

OBJETIVO:

O objetivo deste estudo foi analisar o padrão de expressão endotelial pulmonar de três moléculas de adesão celular na GPA, *in situ*: molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula e adesão vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina.

MÉTODOS:

Examinou-se a expressão endotelial de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina usando marcação imuno-histoquímica em secções de pulmão fixadas e parafinadas de lesões de GPA (n = 8 casos, 90 secções transversais de vasos analisados). Foram também analisados controles positivos: amostras de pulmão de doença intersticial associada à esclerodermia (SScl) (n = 8 casos, 96 secções transversais de vasos analisados) e controles negativos (n = 9 casos, 90 secções transversais de vasos analisados). A

quantificação imuno-histoquímica foi realizada no aumento de 400x usando a técnica de *point-counting*.

RESULTADOS:

ICAM-1: A expressão endotelial mediana de ICAM-1 esteve aumentada de forma semelhante na GPA e na SScI (81% and 73%, respectivamente; $p = 0.97$). A comparação com o grupo controle (26.3%) revelou diferença estatisticamente significativa entre controle e GPA ($p < 0.001$) quanto entre controle e SScI ($p = 0.017$).

VCAM-1: A expressão mediana de VCAM-1 esteve significativamente aumentada na GPA se comparada a SScI (79.5% vs 41.4%; $p = 0.012$), no entanto, a expressão endotelial de VCAM-1 nos controles também esteve moderadamente aumentada (49.8%) e não houve diferença estatística entre SScI e controles ($p = 0.549$) ou entre GPA e controles ($p = 0.242$).

E-selectina: A expressão endotelial mediana de E-selectina esteve aumentada de forma semelhante na GPA e SScI (100% e 88.2%, respectivamente; $p = 0.272$). A comparação com o grupo controle (13.8%) revelou diferença estatisticamente significativa entre controle e GPA ($p < 0.001$) e controle e SScI ($p = 0.045$).

CONCLUSÃO:

Esses achados evidenciam o fenômeno de ativação endotelial pulmonar *in situ* em lesões de GPA. O perfil de expressão de moléculas de adesão parece ter particularidades em diferentes doenças a exemplo da maior expressão de VCAM-1 na GPA em relação à SScI. Essas observações contribuem para o conhecimento fisiopatogênico na GPA.

Descritores: 1. Granulomatose de Wegener 2. Granulomatose com poliangeíte 3. Molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) 4. Molécula 1 de adesão de célula

vascular (VCAM-1) 5.Selectina-E 6. Endotélio vascular 7. Moléculas de adesão
celular

ABSTRACT

Dourado, LBK. *Endothelial activation in granulomatosis with polyangiitis*. [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo”, 2015.

INTRODUCTION:

Vascular and immunologic processes are central to the pathogenesis of granulomatosis with polyangiitis (GPA). Endothelial cellular adhesion molecules have a central role in recruiting leukocytes to sites of inflammation. Moreover, different vascular beds are phenotypically and functionally distinct with regard to expression of cellular adhesion molecules. They have been shown to be elevated in sera and in renal biopsies of patients with active ANCA-associated vasculitis. Despite of that, the expression of cellular adhesion molecules has not been studied *in situ* in the lungs.

OBJECTIVE:

Within this context, the aim of this study was to analyze the *in situ* pulmonary endothelial immunohistochemical pattern of expression of three cellular adhesion molecules in GPA: intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and E-selectin . **METHODS:** For such, we examined formalin-fixed, paraffin-embedded sections of lung lesions of GPA (n = 8 cases, 90 transverse sections of pulmonary vessels), negative controls which were obtained from autopsies (n = 9 cases, 90 transverse sections of pulmonary vessels analyzed) and positive controls which were cases of interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SScI) (n = 8 cases, 96 transverse sections of pulmonary vessels). The quantification of the immunohistochemical staining was performed at x400 magnification using the technique of point-counting, previously described.

RESULTS:

ICAM-1: Median endothelial expression of ICAM-1 was similarly enhanced in GPA and SScl (81% and 73%, respectively; $p = 0.97$). When compared to controls (26.3%), both GPA ($p < 0.001$) and SScl ($p = 0.017$) had significantly higher endothelial expression of ICAM-1.

VCAM-1: Median endothelial expression of VCAM-1 was significantly enhanced in GPA when compared to SScl (79.5% vs 41.4%; $p = 0.012$), however the endothelial expression of VCAM-1 in the controls was also moderately enhanced (49.8%) and no statistically significant difference was found between SScl and controls ($p = 0.549$) or between GPA and controls ($p = 0.242$).

E-selectin: Median endothelial expression of E-selectin was similarly enhanced in GPA and SScl (100% and 88.2%), respectively; $p = 0.272$. When compared to controls (13.8%), both GPA ($p < 0.001$) and SScl ($p = 0.045$) had significantly higher endothelial expression of E-selectin.

CONCLUSION:

These observations are evidence of *in situ* pulmonary endothelial activation in lesions of GPA. The profile of expression of cellular adhesion molecules seems to be particular for each disease state and timing as evidenced by the enhanced expression of VCAM-1 in GPA when compared to SScl. These observations add information to the pathogenetic knowledge of GPA.

Keywords (MESH Terms): 1. wegener granulomatosis; 2. granulomatosis with polyangiitis; 3. ICAM-1; 4. VCAM-1; 5. E-selectin; 6. endothelium, vascular 7. cell adhesion molecules;

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

A granulomatose com poliangeíte (GPA), antiga granulomatose de Wegener, foi reconhecida como entidade clinico-patológica distinta em 1936 quando Dr Wegener descreveu três pacientes portadores de uma “granulomatose rinogênica peculiar”.¹

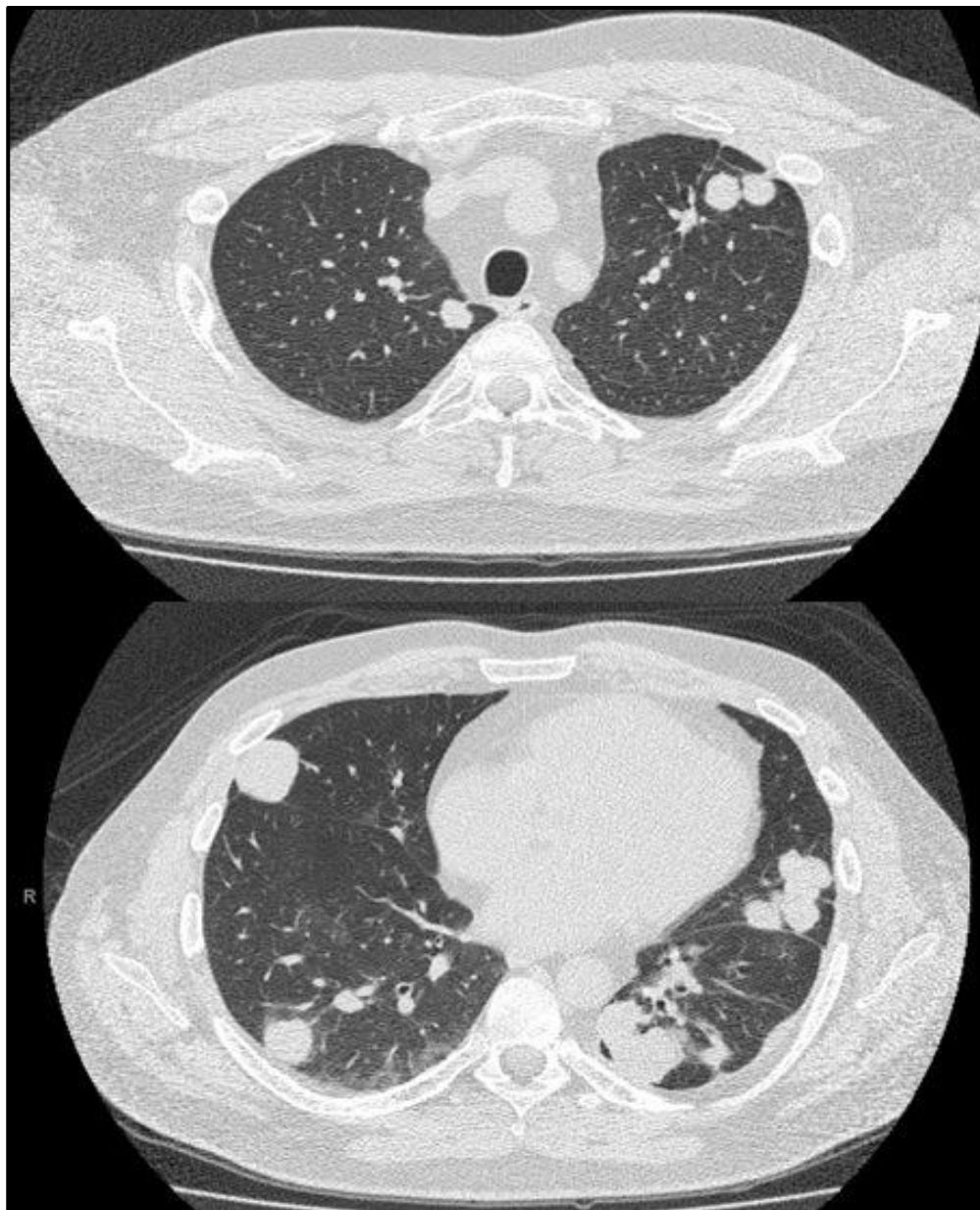
Mais recentemente, houve um movimento no sentido de mudança do nome da granulomatose de Wegener por GPA.^{2,3} Dessa forma, acatando um movimento internacional, usaremos “GPA” em lugar de granulomatose de Wegener. E na verdade, a nomenclatura das vasculites associadas aos anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) está em processo de mudança à medida que se avança a compreensão fisiopatológica da doença e seu espectro de manifestações clínicas.⁴

A GPA faz parte do grupo de vasculites associadas ao ANCA e além da GPA, fazem parte desse grupo: a poliangeíte microscópica e a Síndrome de Churg-Strauss.

O complexo clínico-patológico da GPA é caracterizado por inflamação necrotizante e granulomatosa de vias aéreas superiores e inferiores, pulmões, glomerulonefrite, e vasculite sistêmica – trato gastrointestinal, pele etc –.^{5,6} Clinicamente, a apresentação típica consiste em lesões nodulares/massas cavitadas em pulmão, hemoptise, dispnéia, epistaxe sanguinolenta/purulenta e insuficiência renal. Múltiplos órgãos são envolvidos, havendo uma predileção pelo acometimento de vias aéreas superiores e pulmões, rins e acometimento ocular.⁷

Os achados radiográficos do tórax mais comuns da doença são nódulos ou massas, vidro fosco e consolidações com cavitação. Menos frequentemente, observam-se linfonodos mediastinais, derrame pleural e espessamento brônquico (figura 1).⁸

Figura 1: Tomografia computadorizada do tórax de alta resolução. Granulomatose com poliangeíte. Note a presença de nódulos e discreta área de vidro fosco próximo a alguns nódulos. Do ambulatório de vasculites, pneumologia, InCor, FMUSP.

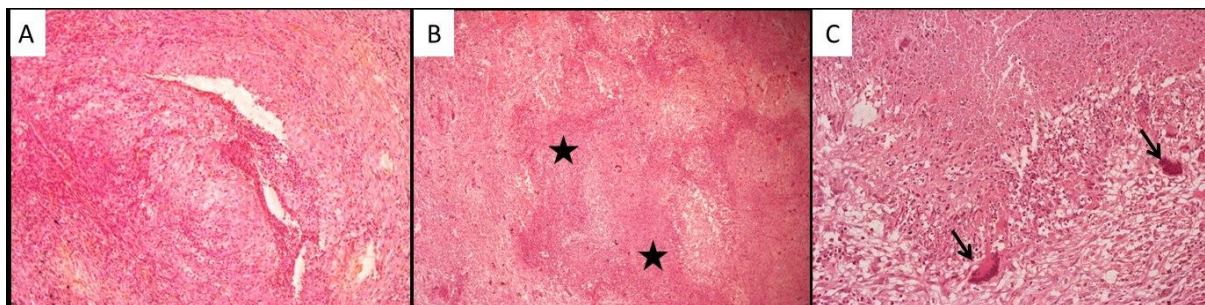


Do ponto de vista sorológico, observa-se na GPA a presença do ANCA em dois padrões de acordo com a imunofluorescência: c-ANCA ou p-ANCA. Um resultado positivo na imunofluorescência deve ser confirmado com ensaio imunoenzimático

(ELISA): o padrão c-ANCA da imunofluorescência corresponde ao padrão ANCA-PR3 pelo ELISA e o padrão p-ANCA corresponde ao padrão ANCA-MPO.^{9,10} 90% a 95% dos pacientes com doença generalizada apresentam ANCA positivo. Dos pacientes com GPA ANCA positivos, 80 a 90% apresentam ANCA-PR3 e os restantes ANCA-MPO.^{11,12} Ainda do ponto de vista sorológico, mais recentemente foi identificado um novo autoanticorpo: anti-proteína-2 de membrana lisossomal humana (hLAMP-2). Esse anticorpo é altamente prevalente nas vasculites associadas ao ANCA sendo, em um estudo, detectável em 93% dos pacientes portadores de glomerulonefrite necrotizante pauci-imune onde o ANCA-MPO e o ANCA-PR3 foram detectados em apenas 50% dos casos.¹³ Conhecendo o valor patogênico do ANCA, a descoberta do hLAMP-2 provavelmente pode explicar os casos clínico-histopatológicos de vasculite associada ao ANCA onde ANCA-PR3 e ANCA-MPO são negativos.¹⁴ O hLAMP-2 apresenta reação cruzada com epítomos de partes de algumas bactérias gram-negativas. Tal achado pode significar que infecções por bactérias gram-negativas podem desencadear autoimunidade mediante mimetismo molecular - in vivo.^{13,15}

Histologicamente, a GPA no pulmão é classicamente caracterizada por uma vasculite necrotizante que usualmente é associada a inflamação granulomatosa e necrose geográfica do parênquima (figura 2) (6, 16-18). Em algumas situações pode ter a apresentação de hemorragia alveolar e capilarite e nessa situação, a inflamação granulomatosa está ausente (6).

Figura 2: Achados histopatológicos clássicos da granulomatose com poliangeíte: A. vasculite necrotizante (neutrofílica) com destruição arterial. B. Necrose geográfica do parênquima (estrelas). C. inflamação granulomatosa, presença de células gigantes (setas). Coloração: Hematoxilina & Eosina. Do arquivo de patologia do HC-FMUSP



1.2 Patogênese da granulomatose com poliangeíte

Os mecanismos patogênicos que geram todos esses achados clínicos e patológicos acima mencionados são complexos e não completamente elucidados. A lesão tecidual na GPA resulta da interação entre um evento inflamatório inicial e uma resposta imune orquestrada. A presença de inflamação granulomatosa sugere o envolvimento da imunidade celular e, de fato, linfócitos T ativados CD4 e CD8 se encontram presentes no soro de pacientes tanto na fase de atividade da doença quanto na fase de remissão.¹⁹ No entanto, o grande efetor da lesão tecidual da GPA parece ser o neutrófilo mediante interação com ANCA e endotélio ativado. Essa interação será discutida a seguir:

1.2.1 Evento inflamatório inicial e fatores de risco

O ANCA é reconhecidamente patogênico e não só marcador de doença.²⁰⁻²³ A explicação sobre o que desencadeia a produção do ANCA ainda não foi satisfatoriamente esclarecida. Muitas hipóteses foram levantadas acerca do estímulo à produção do ANCA, dentre elas a teoria de complementariedade de antígenos numa rede idiotípica/anti-idiotípica; a teoria de mimetismo molecular, a exemplo do h-LAMP-2, anticorpo recentemente descoberto, presente na maioria de pacientes com vasculite ANCA, que tem homologia com uma proteína (FimH) expressa em algumas bactérias gram-negativas; e a teoria de que neutrófilos liberam e assim ficam circundados por uma rede de cromatina aglutinada (*neutrophil nets*) onde MPO e PR3 estão disponíveis para iniciar e perpetuar a lesão autoimune.^{4,24} Além das teorias fisiopatogênicas, outras associações, ou fatores de risco, foram encontrados em relação ao desenvolvimento e manutenção das vasculites ANCA: exposição à sílica, infecção por *Staphylococcus aureus*, infecção viral (Parvovírus B19) deficiência de alfa-1-anti-tripsina e algumas drogas num contexto de predisposição genética à autoimunidade.²⁵

1.2.2 Papel patogênico do ANCA

À luz do conhecimento atual, reconhece-se que o ANCA tem papel patogênico nas lesões vasculíticas da GPA e os mecanismos responsáveis pela sua patogenicidade vem sendo extensamente avaliados desde a descoberta de dois antígenos que o desencadeiam: a mieloperoxidase (MPO) e a proteinase 3 (PR3).¹⁵

Diversos níveis de evidência suportam o papel patogênico do ANCA estimulando neutrófilos a se tornarem os principais efetores da lesão vasculítica.^{21,26}

- Neutrófilos estimulados (“*primed*”) por citocinas pró-inflamatórias e fator de necrose tumoral (TNF) expressam PR3 e MPO na sua superfície. Quando neutrófilos ativados são incubados em soro que contém ANCA-PR3 ou ANCA-MPO, a ativação neutrofílica se completa e são liberados espécies reativas de oxigênio e enzimas líticas capazes de causar lesão tecidual.²¹

O primeiro modelo experimental que provou o papel patogênico do ANCA foi descrito em 1993: o estudo envolveu ratos que foram imunizados contra mieloperoxidase humana (desenvolveram anticorpos antimieloperoxidase humana que apresentavam reação cruzada com a mieloperoxidase murina). Quando o rim desses ratos foi perfundido com produtos de neutrófilos ativados, ocorreu uma glomerulonefrite necrotizante crescêntica pauci-imune. Modelo semelhante aplicado ao pulmão também levou a vasculite pulmonar.²⁷ Após esse experimento, outros também confirmaram a patogenicidade do ANCA-MPO em causar vasculite pauci-imune.²⁸

Em contraste com os vários modelos experimentais de vasculite associada ao ANCA-MPO, um modelo animal que reproduz a vasculite associada ao ANCA-PR3 não pode ser desenvolvido até agora. É possível que a menor homologia estrutural e funcional entre o PR3 murino e humano explique em parte a dificuldade de gerar um modelo experimental de vasculite ANCA-PR3 mediada.^{15,21}

Apesar da ausência de modelos experimentais documentando o papel patogênico do ANCA-PR3, há várias evidências a favor de seu papel central como causador das vasculite associadas ao ANCA-PR3:

- Elevada especificidade do ANCA-PR3 para o diagnóstico de vasculite associada ao ANCA dentro de um contexto clínico suspeito de vasculite.¹²

- Elevações nos títulos do ANCA-PR3 estão relacionadas com episódios de atividade da vasculite.²⁹

- ANCA-PR3 é capaz, *in vitro*, de estimular neutrófilos ativados a produzir espécies reativas de oxigênio e enzimas líticas.²²

- Proteína complementar transcrita do *antisense* DNA do PR3 está envolvida na geração de anticorpos anti-PR3 (ANCA-PR3) numa rede idiotípica/anti-idiotípica em modelo murino.³⁰

- Durante a estimulação “*priming*” de neutrófilos o PR3 é expresso na membrana de neutrófilos, tornando esse antígeno de localização citoplasmática disponível para interação com o ANCA-PR3.²²

- Expressão persistente do antígeno PR3 na membrana de neutrófilos durante períodos de remissão da vasculite está associada a um maior risco de recaída.²³

- Na fase inicial da apoptose de neutrófilos, ocorre a expressão na membrana de antígeno citoplasmático PR3 que por sua vez reduz a atividade fagocítica de macrófagos dessas células apoptóticas, além de estimular a produção do ANCA-PR3, provavelmente perpetuando o estímulo inflamatório e favorecendo a autoimunidade.^{20,31,32}

Portanto, apesar da ausência de modelo animal de vasculite induzida por ANCA-PR3, há várias evidências indicando seu papel patogênico na lesão vasculítica ANCA relacionada.

1.2.3 Papel do endotélio na granulomatose com poliangeíte

Para ocorrer lesão histológica nas vasculites ANCA mediadas, é preciso que leucócitos ativados na presença do ANCA interajam com o endotélio local, mostrando predileção por determinados leitos vasculares em detrimento de outros. Para efetuar a lesão, o neutrófilo precisa aderir ao endotélio, lesando as células endoteliais, migrando através delas para os tecidos e causando lesão tecidual por meio da degranulação, liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio.³³

O início do reconhecimento da interação entre leucócitos e endotélio na inflamação veio junto com o desenvolvimento da técnica de microscopia intravital e data de 1839. Nesses primeiros experimentos em sapos, notou-se a presença de leucócitos (chamados na época de corpúsculos de linfa) movendo-se mais lentamente que outros constituintes do sangue e em contato direto com o endotélio.³⁴

Desde os primeiros experimentos observando a interação 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 (é ativado) como consequência de lesão ou situações patológicas que induzem a produção de citocinas, entre outros

fatores pró-inflamatórios, que levam por sua vez a expressão de moléculas de adesão que irão modular a interação do endotélio com leucócitos.

A interação entre leucócitos e endotélio no local de inflamação é chamada cascata de ativação leucocitária. O endotélio precisa estar ativado, o que significa estar expressando ou aumentando a expressão basal de moléculas de adesão celular. A cascata de ativação leucocitária pode ser dividida de maneira simplificada em: rolamento leucocitário sobre endotélio, adesão e migração através das células endoteliais para os tecidos detalhados simplificados a seguir:^{34,35}

- **Rolamento leucocitário:** 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.³⁴

- Os leucócitos se ligam às selectinas do endotélio por meio 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.³⁴

- **Adesão Leucocitária:** Esses estímulos inflamatórios ativam as integrinas nos leucócitos (β_2, α_4) aumentando sua afinidade e atividade. A ativação das integrinas permitirá sua ligação com moléculas da superfamília das imunoglobulinas (VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2) expressas nas células endoteliais promovendo assim a firme adesão dos leucócitos ao endotélio.³⁴ A ICAM-1 é

expressa de maneira constitutiva nas células endoteliais, mas tem sua expressão significativamente aumentada mediante estímulo inflamatório. Já a VCAM-1 só se expressa na superfície endotelial mediante estímulos como TNF, endotoxina e interleucina-1 (IL-1).³⁶

- **Migração leucocitária:** 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 medeiam ativamente a passagem dos leucócitos para os tecidos.³⁷ 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-1.³⁵

1.3 Moléculas de adesão celular

Portanto, o aumento da expressão de moléculas de adesão celular (ex. ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) acima descrito é parte da cascata de ativação leucocitária e é fator necessário – mas não exclusivo – para que ocorra o fenômeno de ativação endotelial. Outras proteínas de membrana e de transdução de sinal, fenômenos intracitoplasmáticos são também parte desse fenômeno denominado “ativação endotelial”.

1.3.1 Moléculas de adesão celular na granulomatose com poliangeíte

Em específico na GPA, existem evidências mostrando elevação sérica de moléculas de adesão solúveis (ICAMs, VCAMs), indicando uma ativação endotelial na doença ativa, assim como em biópsias renais na GPA.³⁸⁻⁴⁰ Há também evidência de que os níveis séricos dessas proteínas variam de acordo com a atividade da doença.⁴¹ No entanto, a detecção de elevação dos níveis séricos dessas moléculas de adesão não informa a respeito do comportamento local de cada órgão envolvido. O perfil de ativação endotelial no pulmão acometido pela GPA ainda não foi estudado *in situ*. Sabe-se que diferentes leitos endoteliais têm diferentes comportamentos em relação à expressão de moléculas de adesão mediante um mesmo estímulo. Essas diferenças fenotípicas podem em parte explicar a predileção por determinados órgãos na GPA.⁴²

2. HIPÓTESE DO ESTUDO

A hipótese principal do estudo é:

- Deve haver ativação do endotélio vascular pulmonar nas lesões da GPA

Secundariamente:

- O perfil de ativação endotelial vascular na GPA deve ter características fenotípicas próprias

3. OBJETIVOS

Objetivo primário:

- Demonstrar a ativação endotelial vascular mediante análise da expressão de moléculas de adesão celular em amostras de pulmão acometidos pela GPA obtidos por meio de biópsia cirúrgica.

Objetivo secundário:

- Comparar o perfil de ativação endotelial (o perfil de expressão de moléculas de adesão) em amostras de pulmão na GPA com o perfil de ativação endotelial em amostras de pulmão de pacientes com esclerodermia, doença que sabidamente apresenta aumento de expressão de moléculas de adesão em pele e em amostras pulmonares acometidas por doença intersticial.⁴³⁻⁴⁷

4. MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo transversal: análise semiquantitativa utilizando técnicas imuno-histoquímicas para aferir a expressão no endotélio vascular pulmonar de moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) - que são marcadores de ativação endotelial - em amostras pulmonares de GPA, de esclerodermia e em controles normais.

4.2 Amostras estudadas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto do Coração (Incor) número n. 303/11. O termo de consentimento livre e esclarecido não foi exigido já que analisamos amostras pulmonares, produto de biópsias cirúrgicas, arquivadas no departamento de patologia HC-FMUSP. As amostras dos controles normais foram obtidas no momento da realização da autópsia.

4.2.1 Amostra de casos de granulomatose com poliangéite

Foram selecionadas para análise todas as biópsias pulmonares (n = 30) realizadas entre 1992-2010 em pacientes rigorosamente diagnosticados como GPA e que preenchiam os critérios de classificação da ACR⁴⁸ do ambulatório de vasculites da disciplina de pneumologia-FMUSP, disponíveis no arquivo de patologia do HC-FMUSP.

4.2.2 Amostra de casos de esclerodermia

Selecionadas aleatoriamente biópsias pulmonares (n = 8) de pacientes rigorosamente diagnosticados como esclerodermia,⁴⁹ disponíveis no arquivo de

patologia do HC-FMUSP. Biópsias pulmonares realizadas entre 2001-2004 para avaliação de doença intersticial relacionada a esclerodermia.

4.2.3 Amostra de controles normais

Coletadas amostras pulmonares consecutivas (n = 9), produto de autópsias realizadas no Instituto Médico Legal de São Paulo no ano de 2014, onde o pulmão encontrava-se normal na macroscopia e na microscopia pela coloração de hematoxilina e eosina (HE).

4.3 Análise das amostras

4.3.1 Caracterização morfológica

Todas as amostras de biópsias pulmonares de pacientes com GPA e esclerodermia foram revistas ao HE para fins de descrição morfológica e checagem diagnóstica. As amostras de GPA foram classificadas de acordo com Katzenstein em:⁵

- forma clássica
- variante BOOP-like
- hemorragia alveolar/capilarite

As amostras pulmonares de pacientes com esclerodermia foram classificadas de acordo com descrições morfológicas de pneumonias intersticiais.⁵⁰

A seguir, as amostras de GPA, esclerodermia e controle foram submetidas à coloração imuno-histoquímica para quantificação da expressão dos marcadores de ativação endotelial ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, técnica descrita a seguir:

4.3.2 Preparo das amostras e técnica imuno-histoquímica

Os três grupos (GPA, esclerodermia e controle) tiveram blocos de parafina submetidos a cortes histológicos de 4 μ m de espessura com o uso de um micrótomo e montados sobre lâminas de microscopia silanizadas.

A preparação das lâminas foi realizada no laboratório do departamento de patologia FMUSP.

As lâminas silanizadas foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica: primeiramente foram desparafinadas. Em seguida, o tecido foi hidratado. O próximo passo foi a recuperação antigênica. Na sequência, procedeu-se ao bloqueio das peroxidases endógenas, em seguida, o bloqueio de sítios inespecíficos e finalmente a adição de anticorpos primários nas seguintes diluições cada um em uma lâmina pré-processada e incubada *over-night* a temperatura de 4° a 8°C:

1. ICAM-1 (NCL-CD54-307): monoclonal de camundongo, clone 23G12, Laboratório Leica Biosystems - Divisão Novocastra, New Castle, Inglaterra. Diluição 1:50.
2. VCAM-1 (E-10): sc-13160, monoclonal de camundongo, Laboratório Santa Cruz biotechnology, California, USA. Diluição 1:100.

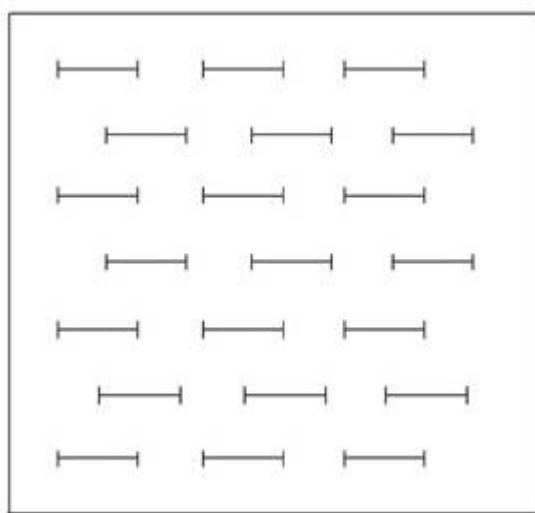
3. E- selectina (NCL-CD62E-382-CD62E): monoclonal de camundongo, clone 16G4, Laboratório Leica Biosystems - Divisão Novocastra, New Castle, Inglaterra. Diluição 1:20.

Utilizou-se sistema de amplificação e revelação dos anticorpos. Para cada marcador, utilizou-se um controle interno positivo e negativo.

4.3.3 Determinação dos índices imuno-histoquímicos

Para determinar os índices de expressão imuno-histoquímicos dos antígenos expressos pelo endotélio vascular pulmonar, foi usada a técnica de *point-counting*, brevemente descrita a seguir, utilizando retículo contendo 100 pontos e 50 retas (figura 3).⁵¹

Figura 3: Exemplo de retículo semelhante ao utilizado neste estudo. Nesta figura, consta um retículo de 21 retas e 42 pontos. O retículo utilizado neste trabalho era composto por 50 retas e 100 pontos.



Foi confeccionada uma lâmina para cada marcador para cada caso/paciente. Foram analisados 10 campos microscópicos por lâmina ao aumento de 400X, com retículo montado, percorrendo a lâmina com movimentos centrífugos, partindo de um ponto central da lâmina. A busca por um campo analisável se concretizava quando um vaso era identificado. Cada campo, portanto, conteve uma secção transversal de um vaso ou mais.

Com o vaso no campo de visão, sob o retículo de 50 retas e 100 pontos, contabilizaram-se apenas os pontos (positivos e negativos) que incidiam no endotélio vascular. Pontos recaindo sobre qualquer outra região do parênquima pulmonar que não o endotélio foram desconsiderados (mesmo que apresentando positividade ao marcador imuno-histoquímico). Os valores de positividade de cada marcador no endotélio vascular pulmonar foram expressos em porcentagem de pontos positivos sobre o endotélio pelo total de pontos que incidiram no endotélio, segundo a fórmula:

Índice imuno-histoquímico de um determinado marcador (ex. ICAM-1):

$$1. \quad (P_{\text{POSITIVOS}} / P_{\text{ENDOTÉLIO}}) \times 100$$

Onde:

$P_{\text{POSITIVOS}}$: número de pontos no endotélio vascular que incidem sobre a positividade do marcador imuno-histoquímico.

$P_{\text{ENDOTÉLIO}}$: total de pontos (positivos e negativos) que incidem sobre o endotélio vascular.

O índice de expressão imuno-histoquímico de um determinado marcador em um determinado caso foi a média dos resultados $P_{\text{POSITIVOS}}$ e $P_{\text{ENDOTÉLIO}}$ de todos os 10 campos analisados em cada caso.

A leitura semi-quantitativa das marcações imuno-histoquímicas foram feitas por Leticia Kawano Dourado, Dra Vera Capelozzi e Dr Alexandre Ab'saber com índice de discordância interobservador máximo de 10%. Divergências foram revisadas conjuntamente e resolvidas em consenso.

4.4 Análise estatística

Para comparar as distribuições da porcentagem de positividade nos três grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. A localização das diferenças entre os grupos foi feita por meio do procedimento proposto por Dunn e os p-valores obtidos foram corrigidos pelo método de Bonferroni.

Nos testes de hipótese foi fixado nível de significância de 0,05.

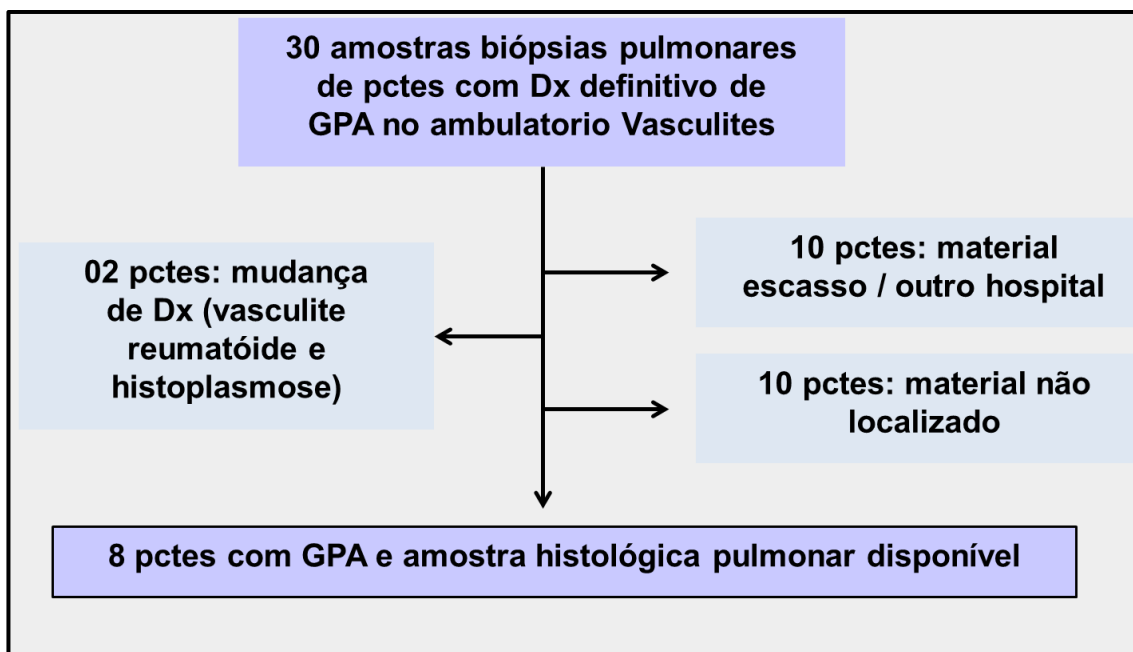
A análise foi realizada com o auxílio do aplicativo SPSS (versão 18).

5. RESULTADOS

5.1 Casos de granulomatose com poliangeíte incluídos na análise

Foram apenas considerados para inclusão no estudo aqueles casos de pacientes com amostra histológica arquivada e preenchimento dos critérios da ACR para GPA (48). Pacientes com vasculite associada ao ANCA mas que não preenchiam critérios para o subtipo GPA não foram incluídos. A figura 4 ilustra o número final de amostras de GPA analisadas (n = 8).

Figura 4: Diagrama de inclusão e exclusão de amostras pulmonares de pacientes com GPA do ambulatório de vasculites da disciplina de pneumologia - InCor – FMUSP arquivadas no departamento de patologia HC-FMUSP.



Abreviações: GPA: granulomatose com poliangeíte; Dx: diagnóstico; ptes: pacientes.

5.2 Características clínicas das amostras estudadas

Todas as amostras histológicas de GPA foram produto de ressecção de nódulos ou massas durante a investigação diagnóstica que definiu o diagnóstico (figura 5; tabela 8 - anexo). As amostras de esclerodermia randomicamente

selecionadas (n = 8) foram realizadas entre 2001-2004, período em que havia a prática de biopsiar a doença intersticial relacionada à esclerodermia antes de se iniciar tratamento específico para a doença pulmonar, conforme rotina no serviço. Nenhuma das pacientes portadoras de esclerodermia apresentava hipertensão pulmonar clínica conforme revisão de

prontuário; no entanto, todas as amostras do grupo esclerodermia apresentavam artérias com hipertrofia da camada média e proliferação intimal, indicando acometimento vascular subclínico. Vide tabela 1.

Figura 5: Granulomatose com poliangeíte. Produto de ressecção cirúrgica: Nódulo necrótico, necrose geográfica perinodular (setas). Vista panorâmica. Coloração HE. Do arquivo do departamento de Patologia HC-FMSUP.

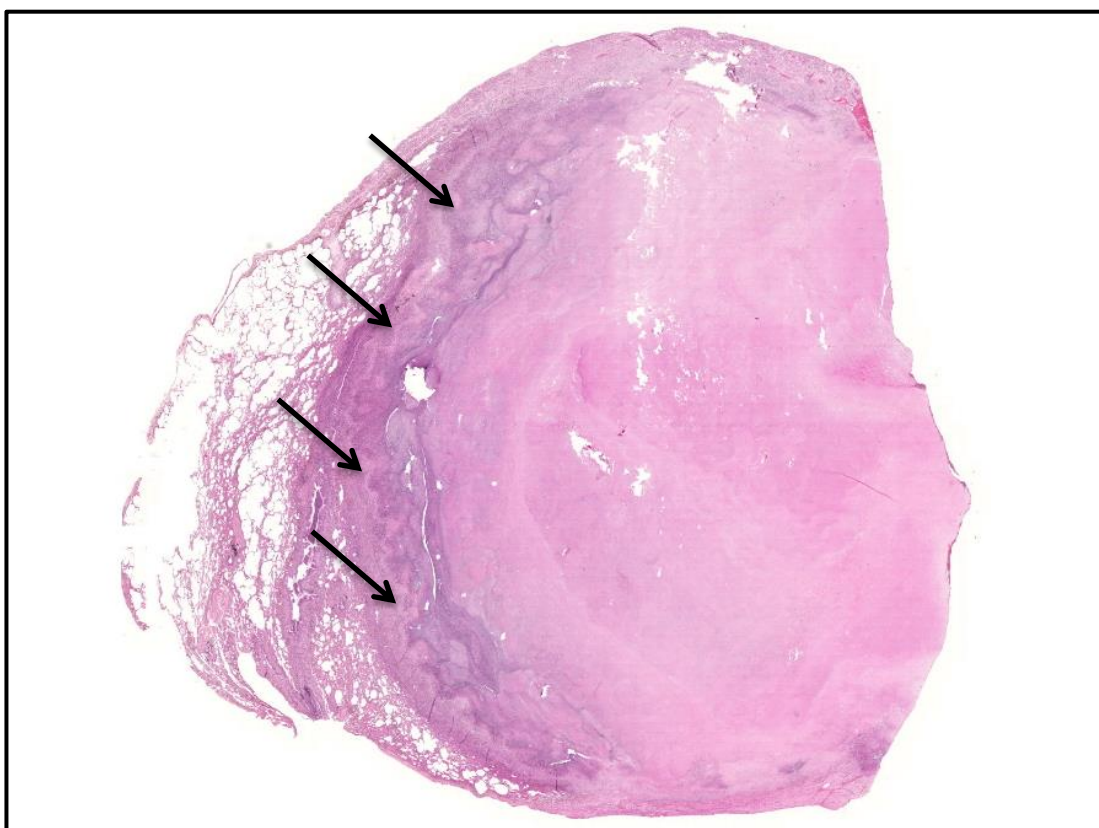


Tabela 1: Dados clínicos e morfológicos das amostras de GPA e esclerodermia

| Característica ¹ | GPA (n=8) | SScl (n=8) |
|--|---|---|
| Idade em anos | 42 ± 9.6 | 44 ± 5.7 |
| Gênero feminino | 2 (25%) | 8 (100%) |
| Tabagista ativo | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Hipertensão pulmonar arterial ² | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Duração da doença em anos | 1 (0.75) | 4 (4.75) |
| Aspecto radiológico | nódulo / massa 8 (100%) | VF / reticulado 8 (100%) |
| Diagnóstico histopatológico ³ | GPA clássica 7 (87%) Boop-like 1 (13%) | PINE fibrótica 7 (87%) Broncocêntrica ⁴ 1 (13%) |

NOTA: Dados apresentados como média e desvio padrão, ou mediana e intervalo interquartil, ou número absoluto de pacientes e porcentagem.

¹ No momento da biópsia.

² Nenhum dos pacientes apresentaram pressão sistólica estimada da artéria pulmonar maior que 40mmHg em ecodopplercardiograma de rotina anual (revisão de prontuário).

³ De acordo com Katzenstein and Askin´s Surgical Lung Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease. 4th edition ed. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier; 2006.

⁴ Pneumonia intersticial fibrótica de distribuição broncocêntrica

Abreviações: GPA: granulomatose com poliangeíte; SScl: esclerodermia; VF: opacidades em vidro fosco; Boop: bronquiolite obliterante com pneumonia em organização; PINE: pneumonia intersticial não específica;

5.3 Expressão de marcadores de ativação endotelial

Nas tabelas 2 a 4 e nas figuras 6 a 8 são encontrados os resumos descritivos da porcentagem de positividade nos grupos controle, GPA e esclerodermia com os marcadores de ativação endotelial: ICAM-1, VCAM-1, e E-selectina, respectivamente. As médias e medianas observadas no GPA e esclerodermia são maiores que no controle nos marcadores ICAM-1 e E-selectina. Destaca-se a homogeneidade dos valores observados no grupo GPA no marcador E-selectina. Na tabela 3 (VCAM-1), nota-se que as maiores média e mediana foram observadas no GPA em relação à esclerodermia com diferença estatisticamente significativa. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa no VCAM-1 entre GPA e controles ou no VCAM-1 entre esclerodermia e controles. O paciente que apresentou a forma BOOP-like da GPA não diferiu dos demais pacientes portadores da forma clássica de GPA em relação a positividade dos marcadores.

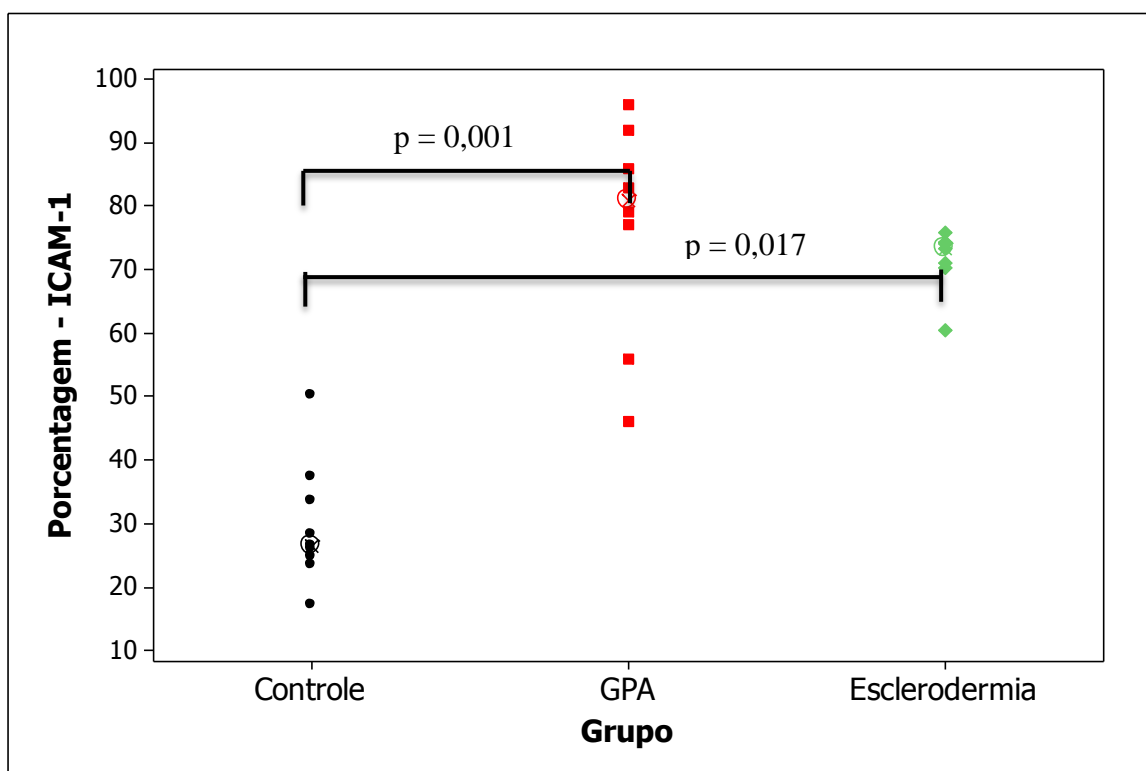
As médias individuais de cada paciente e as medianas da porcentagem de positividade nos três grupos podem ser visualizados nas figuras 6 a 8, para os marcadores ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, respectivamente. As figuras 9 a 11 ilustram o aspecto de positividade dos marcadores ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina nos três grupos: GPA, esclerodermia e controles. As tabelas onde constam as médias individuais dos índices imuno-histoquímicos de cada paciente/caso encontram-se no ANEXO. Houve homogeneidade nos achados dos vasos analisados intraindividualmente. Portanto a média dos campos analisados em cada indivíduo traduziu o fenômeno observado e não apenas a tendência central intraindividual.

Tabela 2- ICAM-1 Resumo descritivo da porcentagem de positividade nos grupos controle, GPA e esclerodermia no marcador ICAM-1

| Grupo | N | Média | Desvio padrão | Mínimo | Mediana | Máximo | IQR |
|---------------|----|-------|---------------|--------|---------|--------|------|
| Controle | 9 | 29,5 | 9,6 | 17 | 26,3 | 50 | 11,4 |
| GPA | 8 | 76,9 | 17,4 | 46 | 81,0 | 96 | 29,3 |
| Esclerodermia | 7 | 71,3 | 5,1 | 61 | 73,3 | 76 | 4,2 |
| Total | 24 | 57,5 | 25,0 | 17 | 65,4 | 96 | 47,4 |

Abreviações: N: número de pacientes. IQR: intervalo interquartil

Figura 6- ICAM-1: Valores individuais e medianos da porcentagem de positividade nos grupos Controle, GPA e Esclerodermia com o marcador ICAM-1



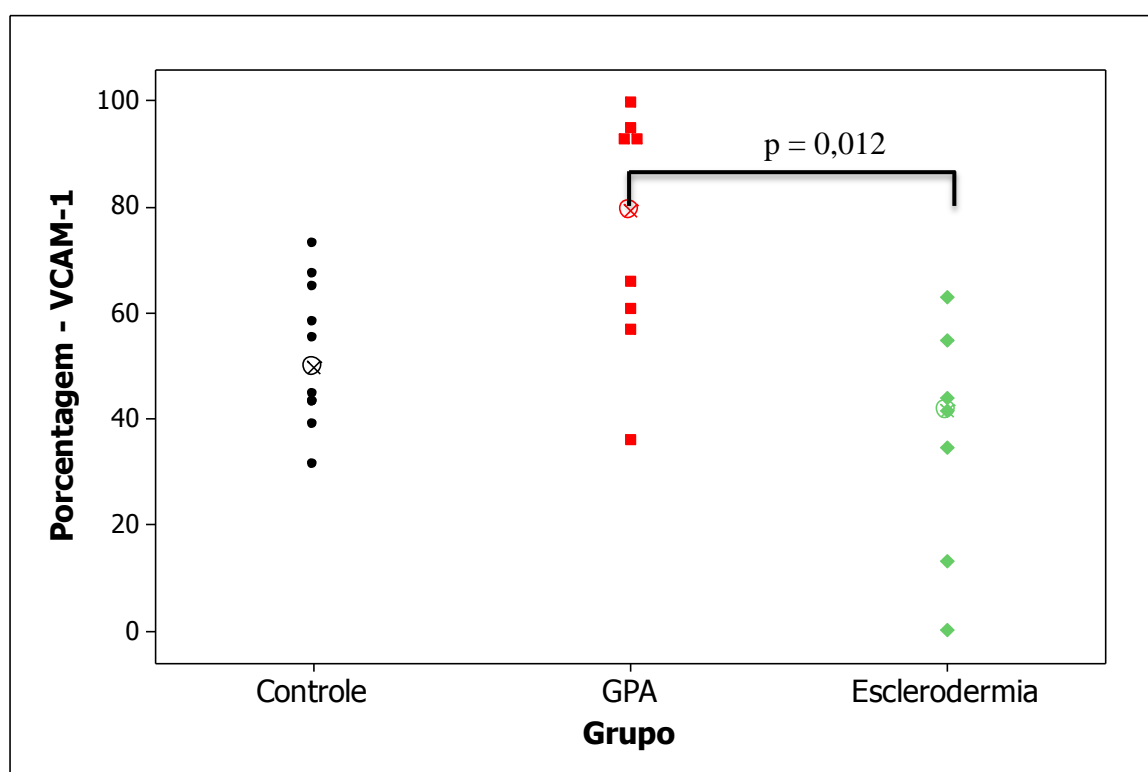
NOTA: Cada ponto representa um paciente, que é a média da análise de 10 campos microscópicos deste paciente. A mediana de cada grupo de pacientes/casos está representada por: ⊗

Tabela 3- VCAM-1: Resumo descritivo da porcentagem de positividade nos grupos Controle, GPA e Esclerodermia com o marcador VCAM-1

| Grupo | N | Média | Desvio padrão | Mínimo | Mediana | Máximo | IQR |
|---------------|----|-------|---------------|--------|---------|--------|------|
| Controle | 9 | 51,9 | 13,8 | 31 | 49,8 | 73 | 23,4 |
| GPA | 8 | 75,1 | 23,3 | 36 | 79,5 | 100 | 36,5 |
| Esclerodermia | 7 | 35,8 | 22,4 | 0 | 41,4 | 63 | 41,7 |
| Total | 25 | 54,8 | 24,5 | 0 | 55,0 | 100 | 26,6 |

Abreviações: N: número de pacientes. IQR: intervalo interquartil

Figura 7- VCAM-1: Valores individuais e medianos da porcentagem de positividade nos grupos Controle, GPA e Esclerodermia com o marcador VCAM-1



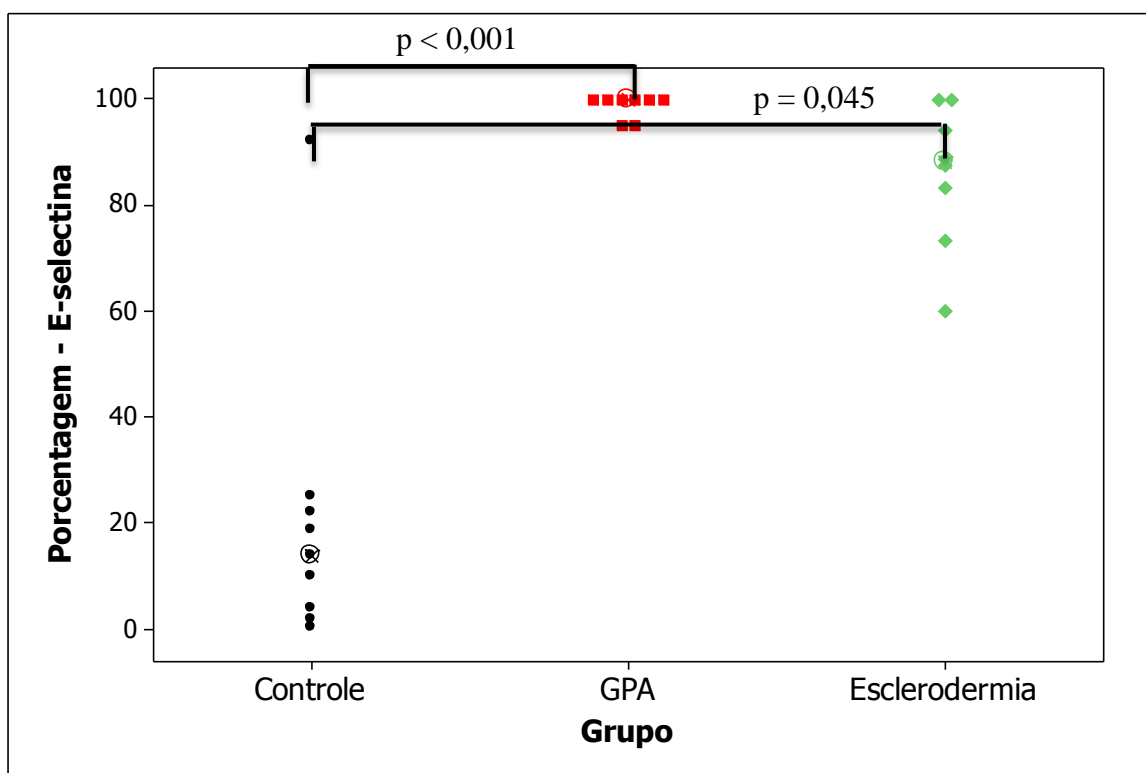
NOTA: Cada ponto representa um paciente, que é a média da análise de 10 campos microscópicos deste paciente. A mediana de cada grupo de pacientes/casos está representada por: ⊗

Tabela 4- E-Selectina: Resumo descritivo da porcentagem de positividade nos grupos Controle, GPA e Esclerodermia com o marcador E-selectina

| Grupo | N | Média | Desvio padrão | Mínimo | Mediana | Máximo | IQR |
|---------------|----|-------|---------------|--------|---------|--------|------|
| Controle | 9 | 20,7 | 28,2 | 0 | 13,8 | 92 | 20,8 |
| GPA | 8 | 98,8 | 2,3 | 95 | 100,0 | 100 | 3,8 |
| Esclerodermia | 8 | 85,9 | 13,7 | 60 | 88,2 | 100 | 22,7 |
| Total | 25 | 66,5 | 39,7 | 0 | 88,9 | 100 | 79,8 |

Abreviações: N: número de pacientes. IQR: intervalo interquartil

Figura 8- E-selectina: Valores individuais e medianos da porcentagem de positividade nos grupos Controle, GPA e Esclerodermia com o marcador E-selectina



NOTA: Cada ponto representa um paciente/caso, que é a média da análise de 10 campos microscópicos deste paciente/caso. A mediana de cada grupo de pacientes/casos está graficamente representada por: ⊗

Figura 9: Granulomatose com poliangeíte: positividade do endotélio vascular pulmonar aos marcadores imuno-histoquímicos de ativação endotelial: ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), e E-selectina (C), Magnificação de 400x.

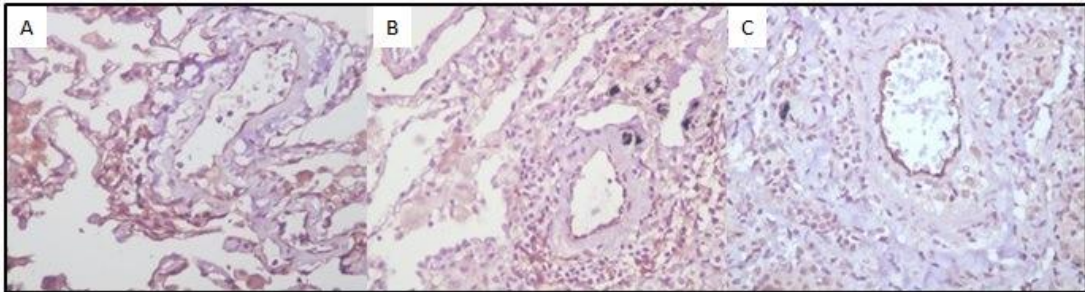


Figura 10: Esclerodermia: Positividade do endotélio vascular pulmonar aos marcadores imuno-histoquímicos de ativação endotelial: ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), e E-selectina (C), Magnificação de 400x. Note a hipertrofia arterial da camada média.

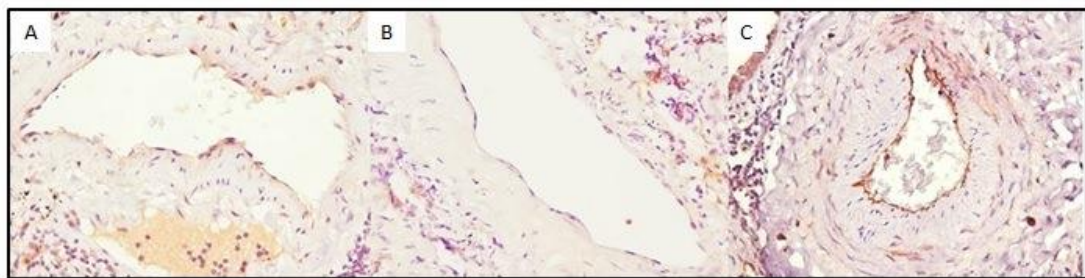
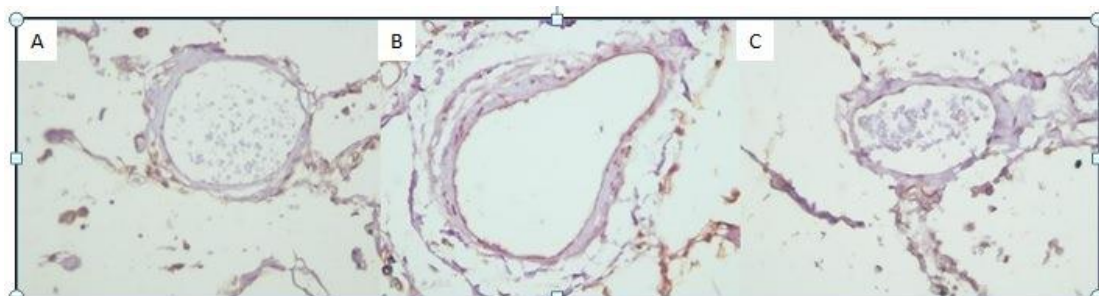


Figura 11: Controles: Positividade do endotélio vascular pulmonar aos marcadores imuno-histoquímicos de ativação endotelial aos marcadores: ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), e E-selectina (C), Magnificação de 400x.



6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do material utilizado

Neste estudo, optamos por analisar amostras rigorosamente diagnosticadas como GPA segundo critérios da ACR e não de vasculites ANCA *sensu lato*. Essa tentativa de homogeneizar as amostras estudadas visou remover o viés que poderia haver em incluir diferentes formas de vasculites ANCA e estas apresentarem diferentes perfis de expressão de moléculas de adesão apenas pelo fato das diferenças fenotípicas de apresentação clínica. O fato de termos rigorosamente selecionado amostras de GPA foi o principal determinante da homogeneidade da característica das amostras de pulmão selecionadas: 100% eram constituídos por nódulos ou massas, já que nódulos e massas são a manifestação pulmonar mais comum na GPA.⁸ Boa parte desses nódulos e massas era constituída por extensas áreas de necrose. A análise de vasos viáveis se deu na periferia dessas lesões, mostrando ativação endotelial perilesional. De fato, em estudo anterior com cintilografia com leucócitos marcados em vasculites ANCA associadas, observou-se extensa captação do marcador difusamente pelos pulmões aparentemente normais de pacientes em avaliação de atividade da doença em outros sítios, mostrando haver recrutamento leucocitário mesmo em áreas aparentemente normais.⁵²

A existência do grupo esclerodermia permitiu a verificação da hipótese secundária que foi averiguar se havia diferenças no perfil de expressão fenotípica de marcadores de ativação endotelial em doenças com características diferentes, uma vez que já era conhecido o aumento da expressão de moléculas de adesão celular na esclerodermia.^{44, 45, 47}

O fato de a maioria das amostras de esclerodermia ser constituída por amostras com mais de um ano de duração da doença e a expressão fenotípica ser constituída

por intersticiopatia fibrótica (não-inflamatória) podem justificar a menor expressão de VCAM-1 conforme resultados de estudos realizados em pele de pacientes com esclerodermia, nos quais se observou uma menor expressão de VCAM-1 em lesões cutâneas tardias (> 1 ano) se comparada a lesões precoces.⁴⁵ Além disso, a presença de vasculopatia subclínica, detectada na avaliação morfológica das amostras de esclerodermia, também pode ter contribuído para a expressão de moléculas de adesão conforme evidenciado previamente em estudos com hipertensão pulmonar na esclerodermia.⁵³ O papel isolado das alterações intersticiais e da vasculopatia não foi aferido neste estudo, abrindo espaço para futuras investigações.

Houve dificuldade em encontrar verdadeiros controles negativos. Os casos resultantes de autópsias apresentaram expressão inesperadamente aumentada de moléculas de adesão (ex. mais expressivo: VCAM-1) o que indica que apesar do aspecto morfológico normal, algum nível de ativação endotelial deva ter ocorrido pré-morte. Além disso, as amostras dos controles eram mais novas (obtidas em 2014) que as amostras arquivadas dos grupos GPA e esclerodermia. Isto determina uma melhor recuperação antigênica nos controles negativos. Apesar do controle negativo não apresentar características ideais, as características acima descritas do grupo controle fortalecem ainda mais a significância encontrada na diferença de expressão dos marcadores ICAM-1 e E-selectina entre controles e GPA e controles e esclerodermia.

6.2 Considerações sobre a técnica imuno-histoquímica

Muitos fatores podem ocorrer como vieses num estudo envolvendo análises imuno-histoquímicas. A recuperação antigênica, por exemplo, é uma das etapas do

processo que pode gerar vieses: apesar de haver evidências de que proteínas permanecem estáveis em blocos de parafina, há evidência de deterioração proteica uma vez que esses blocos são cortados.^{54,55} Dessa forma, análises imuno-histoquímicas realizadas em secções de blocos cortados e logo a seguir corados não enfrentam o viés mencionado acima, no entanto secções (em vez de blocos) arquivadas podem apresentar deterioração proteica induzindo resultados falso-negativos em estudos imuno-histoquímicos. Outras fontes potenciais de viés são: a qualidade da fixação do tecido, que em um estudo retrospectivo não se tem controle sobre esta etapa; a especificidade do anticorpo, a diluição usada e sistemas de detecção. Como meios de reduzir ao máximo esses vieses, procuramos aplicar técnica idêntica para casos e controles, como por exemplo, usamos a mesma diluição de anticorpo e processamento de amostras seguindo uma mesma técnica.

Outra questão significativa em estudos imuno-histoquímicos é a definição de *cut-offs* no espectro de uma onda de luz (cor) entre o que é “positivo” e “negativo”. Esta questão em essência diz respeito à avaliação de intensidade da coloração. Neste estudo, não avaliamos a intensidade do positivo, procedemos apenas à avaliação binária: “positivo, sim ou não” de acordo com avaliação do observador. O “positivo” foi determinado por observadores experientes com verificações de concordância interobservador, e a extensão deste “positivo” foi realizada usando uma técnica semi-quantitativa. Não analisar a intensidade da coloração foi uma medida intencional com intuito de reduzir a subjetividade inerente ao método semi-quantitativo, já que não foi utilizada uma análise automatizada (*computer aid image analysis*). Análises automatizadas têm progressivamente sido utilizadas numa tentativa de aumentar a acurácia das análises imuno-histoquímicas.^{56,57} Problemas com as análises

automatizadas são os custos, necessidade de treinamento especial e no caso do presente estudo, em específico, a dificuldade de definição com precisão da área de interesse no *software*: o endotélio.

A análise da intensidade da coloração agregaria informação à análise semi-quantitativa, mas sem chance de contradizê-la já que extensão e intensidade são variáveis diretamente proporcionais no que se refere a análise de marcadores imuno-histoquímicos.

6.3 Diferenças no perfil de expressão de moléculas de adesão celular entre granulomatose com poliangeíte e esclerodermia

ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina tem sua transcrição regulada por citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeos e outros mediadores inflamatórios.⁵⁸ Estudos mostram que diferentes combinações de citocinas podem modular de maneira diferente a expressão dessas moléculas de adesão celular. Essa característica contribui para o recrutamento seletivo de subtipos leucocitários durante uma resposta imune/auto-imune.⁵⁸ Essas moléculas de adesão são componentes centrais na cascata de ativação leucocitária de doenças com diferentes perfis fenotípicos: desde aquelas onde a célula efetora é o neutrófilo ou macrófago ativado, até aquelas em que a célula efetora principal é o fibroblasto. ICAM-1 e E-selectina estavam igualmente aumentadas na GPA e na esclerodermia em relação aos controles, no entanto, houve uma maior expressão de VCAM-1 na GPA se comparado à esclerodermia que pode estar relacionada a uma diferença no perfil de citocinas que medeia a lesão em cada uma das doenças analisadas. Alguns estudos mostram que IL-4 estimula a expressão de VCAM-1 e não E-selectina ou ICAM-1, demonstrando que diferenças na

expressão de moléculas de adesão possam se dever a particularidades do perfil de citocinas envolvido.^{59,60} A partir dessas observações pode-se inferir que há vias comuns e vias específicas de ativação endotelial. Sepsis por gram-negativos, por exemplo, está associada a endotoxinas circulantes levando à geração de IL-1 e TNF-alfa que por sua vez induzem a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina.⁶¹

A expressão induzida de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina é altamente dependente da síntese de novo RNAm e apresenta cinética própria (pico em horas, duração 24h, em média, *in vitro*). Outros estudos mostram haver mínimo RNAm de ICAM-1 ou VCAM-1 em células endoteliais não estimuladas.⁶²

Essa variedade de vias de ativação endotelial promove regulação em múltiplos níveis da expressão de moléculas de adesão celular, em última análise envolvidas no recrutamento de leucócitos por sítios inflamatórios ou reações imunes.

6.4 Considerações finais

O fenômeno de ativação endotelial na vasculite da GPA pode ser apreendido por meio de vários métodos. Por exemplo, são evidências indiretas de ativação endotelial: a demonstração de elevação nível sérico de partículas do *ectodomain shedding* de moléculas de adesão celular durante a atividade e da GPA; também demonstra de forma indireta ativação endotelial: a observação histológica de infiltração vascular celular, a evidência de fragmentação da lâmina elástica, a apoptose de células endoteliais, e a trombose *in situ* de vasos pulmonares observados em estudos anteriores em vasculites ANCA.^{39,40,63} Neste presente trabalho, o fenômeno de ativação endotelial pulmonar na GPA foi estudado de maneira direta:

demonstramos que moléculas de adesão celular (marcadores de ativação endotelial) tem sua expressão aumentada no endotélio vascular pulmonar em lesões pulmonares da GPA. A necessidade de se estudar a expressão das moléculas de adesão (ativação endotelial) *in situ* e não apenas os seus níveis séricos se justifica pelo fato de que estudos *in vitro* com culturas de diferentes leitos vasculares (pulmão, rim, pele) mostraram que, sob mesmo estímulo pró-inflamatório, há diferenças locais na expressão de moléculas de adesão e, portanto, a análise de níveis séricos das moléculas de adesão representa a resultante de vários leitos endoteliais, não necessariamente traduzindo com precisão as características do fenômeno em um determinado leito vascular específico, por exemplo, o pulmão.⁴² Seguindo o mesmo raciocínio, estudos *in vitro* sobre o assunto usando culturas de células da veia do cordão umbilical (HUVECs) também não traduzirão o que ocorre no leito endotelial específico, ex pulmão.

A demonstração direta do aumento da expressão de moléculas de adesão celular tem relevância em si (autossuficiente) acrescentando compreensão ao mecanismo fisiopatológico da GPA. O componente fisiopatogênico de ativação endotelial vascular pulmonar – mediante o aumento da expressão de moléculas de adesão celular – que se especulava ocorrer, por meio de evidências indiretas, foi aqui demonstrado. Esta ativação endotelial tem particularidades fenotípicas próprias.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou o aumento da expressão de moléculas de adesão, ICAM-1 e E-selectina, em endotélio vascular de lesões pulmonares da GPA. O perfil de expressão de moléculas de adesão tem características particulares, conforme observamos o maior de expressão do VCAM-1 na GPA em relação à esclerodermia.

Os achados deste estudo apreendem o fenômeno vasculítico da GPA por meio da evidência de ativação endotelial pulmonar observada *in situ* ampliando e demonstrando fenômeno fisiopatogênico da doença. Estudos de entendimento fisiopatogênico abrem caminho para estudos com orientação terapêutica.

8. ANEXO

Tabela 5: Grupo controle: Índice de positividade imuno-histoquímico individual para o grupo controle (n = 9) referente ao ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina:

| Casos | ICAM-1 | VCAM-1 | E-selectina |
|-------|--------|--------|-------------|
| 1 | 0,25 | 0,43 | 0,25 |
| 2 | 0,17 | 0,31 | 0,18 |
| 3 | 0,26 | 0,73 | 0,04 |
| 4 | 0,37 | 0,67 | 0,14 |
| 5 | 0,33 | 0,58 | 0,10 |
| 6 | 0,23 | 0,65 | 0,22 |
| 7 | 0,50 | 0,39 | 0,02 |
| 8 | 0,28 | 0,55 | 0,92 |
| 9 | 0,26 | 0,45 | 0,00 |

NOTA: O Índice de positividade imuno-histoquímico para cada caso em um marcador específico é a soma do total do número de pontos positivos divididos pela soma do total de pontos que incidiram no endotélio vascular nos 10 campos analisados.

Tabela 6: Grupo granulomatose com poliangeíte: Índice de positividade imuno-histoquímico individual para o grupo GPA (n = 8) referente ao ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina:

| Pacientes | ICAM-1 | VCAM-1 | E-selectina |
|-----------|--------|--------|-------------|
| 1 | 0,46 | 0,57 | 0,95 |
| 2 | 0,77 | 0,36 | 1 |
| 3 | 0,86 | 1 | 1 |
| 4 | 0,92 | 0,95 | 0,95 |
| 5 | 0,96 | 0,93 | 1 |
| 6 | 0,79 | 0,66 | 1 |
| 7 | 0,56 | 0,61 | 1 |
| 8 | 0,83 | 0,93 | 1 |

NOTA: O Índice de positividade imuno-histoquímico para cada paciente em um marcador específico é a soma do total do número de pontos positivos divididos pela soma do total de pontos que incidiram no endotélio vascular nos 10 campos analisados.

Tabela 7: Grupo Esclerodermia: Índice de positividade imuno-histoquímico individual para o grupo esclerodermia (n = 8) referente ao ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina:

| Pacientes | ICAM-1 | VCAM-1 | E-selectina |
|-----------|--------|--------|-------------|
| 1 | 0,61 | 0,34 | 0,89 |
| 2 | 0,74 | 0,55 | 1 |
| 3 | 0,70 | 0,63 | 0,60 |
| 4 | 0,76 | 0,41 | 0,83 |
| 5 | 0,74 | 0,44 | 0,73 |
| 6 | 0,73 | 0,13 | 0,88 |
| 7 | 0,71 | 0 | 1 |
| 8 | - | - | 0,94 |

NOTA: O Índice de positividade imuno-histoquímico para cada paciente em um marcador específico é a soma do total do número de pontos positivos divididos pela soma do total de pontos que incidiram no endotélio vascular nos 10 campos analisados.

Tabela 8: Granulomatose com poliangeíte: detalhamento individual dos casos em relação aos achados histológicos:

| Pacientes n = 8 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------------|--------------|--------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Granuloma supurativo | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 4 |
| Necrose geográfica | 3 | 3 | 0 | 2 | 4 | 0 | 4 | 3 |
| Vasculite necrotizante | 2 | 3 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 2 |
| BOOP | 2 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Hemorragia alveolar | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 4 |
| Eosinófilos | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 4 | 3 |
| Histiócitos em paliçada | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| Achados na periferia | ndn | PINE | ndn | ndn | ndn | trombo | PINE | edema |
| Diagnóstico | GPA clássica | GPA clássica | BOOP like | GPA clássica | GPA clássica | GPA clássica | GPA clássica | GPA clássica |

NOTA: Legenda utilizada: quantificação subjetiva da porcentagem da lamina apresentando o determinado achado:

1: < 25%

2: 25-50%

3: 50-75%

4: > 75%

Abreviações: BOOP: bronquiolite obliterante com pneumonia em organização; ndn: nada digno de nota; PINE: pneumonia intersticial não específica;

9. REFERÊNCIAS

1. Wegener F. On generalised septic vessel diseases. By Friedrich Wegener, 1937 (translation). *Thorax*. 1987;42(12):918-9.
2. Woywodt A, Haubitz M, Haller H, Matteson EL. Wegener's granulomatosis. *Lancet*. 2006;367(9519):1362-6.
3. Woywodt A, Matteson EL. Wegener's granulomatosis--probing the untold past of the man behind the eponym. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(10):1303-6.
4. Falk RJ, Jennette JC. ANCA disease: where is this field heading? *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(5):745-52.
5. Katzenstein A-L. Katzenstein and Askin's Surgical Lung Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease. 4th edition ed. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier; 2006.
6. Katzenstein ALA. Pulmonary Vasculitis. In: Katzenstein, ALA editor *Surgical Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease*. 2006(4th ed, Philadelphia: Elsevier):217- 36.
7. Antunes T, Barbas CSV. Granulomatose de Wegener. *J Bras Pneumol* 2005;31(Supl 1):S21-S6.
8. Chung MP, Yi CA, Lee HY, Han J, Lee KS. Imaging of pulmonary vasculitis. *Radiology*. 2005;255(2):322-41.
9. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;23; 318((25)):1651-7.
10. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int*. 1998;53(3):796-8.

11. King TE, Stone JH. Clinical manifestations and diagnosis of Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. In: Sheridan, AM (deputy editor) Uptodatecom, 2010. (Capturado em junho 2010 de <http://www.uptodate.com>).
12. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR. The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener granulomatosis. A literature review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1995;123(12):925-32.
13. Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA, et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med.* 2008;14(10):1088-96.
14. Gomez-Puerta JA, Bosch X. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody pathogenesis in small-vessel vasculitis: an update. *Am J Pathol.* 2009;175(5):1790-8.
15. Kain R, Firmin DA, Rees AJ. Pathogenesis of small vessel vasculitis associated with autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens: new insights from animal models. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22(1):15-20.
16. Carrington CB, Liebow A. Limited forms of angiitis and granulomatosis of Wegener's type. *Am J Med.* 1966;41(4):497-527.
17. Gephardt GN, Shah LF, Tubbs RR, Ahmad M. Wegener's granulomatosis. Immunomicroscopic and ultrastructural study of four cases. *Arch Pathol Lab Med.* 1990;114(9):961-5.
18. Katzenstein AL, Locke WK. Solitary lung lesions in Wegener's granulomatosis. Pathologic findings and clinical significance in 25 cases. *Am J Surg Pathol.* 1995;19(5):545-52.

19. Popa ER, Stegeman CA, Bos NA, Kallenberg CG, Tervaert JW. Differential B- and T-cell activation in Wegener's granulomatosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(5 Pt 1):885-94.
20. Day CJ, Hewins P, Savage CO. New developments in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2003;21(6 Suppl 32):S35-48.
21. Kallenberg CG, Heeringa P, Stegeman CA. Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(12):661-70.
22. Kallenberg CG. Pathogenesis of PR3-ANCA associated vasculitis. *J Autoimmun.* 2008;30(1-2):29-36.
23. Rarok AA, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(9):2232-8.
24. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemmarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009;15(6):623-5.
25. de Lind van Wijngaarden RA, van Rijn L, Hagen EC, Watts RA, Gregorini G, Tervaert JW, et al. Hypotheses on the etiology of antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated vasculitis: the cause is hidden, but the result is known. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(1):237-52.
26. Xiao H, Heeringa P, Liu Z, Huugen D, Hu P, Maeda N, et al. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am J Pathol.* 2005;167(1):39-45.

27. Brouwer E, Huitema MG, Klok PA, de Weerd H, Tervaert JW, Weening JJ, et al. Antimyeloperoxidase-associated proliferative glomerulonephritis: an animal model. *J Exp Med*. 1993;177(4):905-14.
28. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest*. 2002;110(7):955-63.
29. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, Oost W, Hermans J, Kallenberg CG, et al. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*. 2000;43(9):2025-33.
30. Pendergraft WF, 3rd, Preston GA, Shah RR, Tropsha A, Carter CW, Jr., Jennette JC, et al. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med*. 2004;10(1):72-9.
31. Durant S, Pederzoli M, Lepelletier Y, Canteloup S, Nusbaum P, Lesavre P, et al. Apoptosis-induced proteinase 3 membrane expression is independent from degranulation. *J Leukoc Biol*. 2004;75(1):87-98.
32. Witko-Sarsat V, Reuter N, Mouthon L. Interaction of proteinase 3 with its associated partners: implications in the pathogenesis of Wegener's granulomatosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2000;12(1):1-7.
33. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(11):4115-9.
34. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008;111(11):5271-81.

35. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-89.
36. Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(1):3-10.
37. Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol.* 2006;80(4):714-8.
38. Arrizabalaga P, Solé M, Abellana R, Ascaso C. Renal expression of adhesion molecules in anca-associated disease. *J Clin Immunol.* 2008;28(5):411-9.
39. De Bandt M, Meyer O, Hakim J, Pasquier C. Antibodies to proteinase-3 mediate expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD 54). *Br J Rheumatol.* 1997;36(8):839-46.
40. Mayet WJ, Schwarting A, Orth T, Duchmann R, Meyer zum Büschenfelde KH. Antibodies to proteinase 3 mediate expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Clin Exp Immunol.* 1996;103(2):259-67.
41. Iwakawa J, Matsuyama W, Kubota S, Mitsuyama H, Suetsugu T, Watanabe M, et al. Increased serum vascular endothelial growth factor levels in microscopic poly angiitis with pulmonary involvement. *Respir Med.* 2006;100(10):1724-33.
42. Tognarelli S, Gayet J, Lambert M, Dupuy S, Karras A, Cohen P, et al. Tissue-specific microvascular endothelial cells show distinct capacity to activate NK cells: implications for the pathophysiology of granulomatosis with polyangiitis. *J Immunol.* 2014;192(7):3399-408.

43. Claman HN, Giorno RC, Seibold JR. Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma. The myth of the "uninvolved skin". *Arthritis Rheum.* 1991;34(12):1495-501.
44. Gruschwitz M, von den Driesch P, Kellner I, Hornstein OP, Sterry W. Expression of adhesion proteins involved in cell-cell and cell-matrix interactions in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 1992;27(2 Pt 1):169-77.
45. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology.* 1993;61(5-6):239-46.
46. Sollberg S, Peltonen J, Uitto J, Jimenez SA. Elevated expression of beta 1 and beta 2 integrins, intercellular adhesion molecule 1, and endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset. *Arthritis Rheum.* 1992;35(3):290-8.
47. Franco de Carvalho E, Parra ER, de Souza R, Muxfeldt A'b Saber A, 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.
48. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* 1994;37(2):187-92.
49. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of

Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative.

Arthritis Rheum. 2013;65(11):2737-47.

50. 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(12):1581-6.

51. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988;96(5):379-94.

52. Jonker ND, Peters AM, Gaskin G, Pusey CD, Lavender JP. A retrospective study of radiolabeled granulocyte kinetics in patients with systemic vasculitis. *J Nucl Med.* 1992;33(4):491-7.

53. Iannone F, Riccardi MT, Guiducci S, Bizzoca R, Cinelli M, Matucci-Cerinic M, et al. Bosentan regulates the expression of adhesion molecules on circulating T cells and serum soluble adhesion molecules in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(8):1121-6.

54. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(15):1054-9.

55. Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, de Roquancourt A, Vérola O, Lesourd A, et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol.* 1998;51(5):370-4.

56. Cross SS. Observer accuracy in estimating proportions in images: implications for the semiquantitative assessment of staining reactions and a proposal for a new system. *J Clin Pathol.* 2001;54(5):385-90.
57. Diaz LK, Sneige N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. *Adv Anat Pathol.* 2005;12(1):10-9.
58. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84(7):2068-101.
59. Thornhill MH, Kyan-Aung U, Haskard DO. IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils. *J Immunol.* 1990;144(8):3060-5.
60. Thornhill MH, Haskard DO. IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor, or IFN-gamma. *J Immunol.* 1990;145(3):865-72.
61. Myers CL, Wertheimer SJ, Schembri-King J, Parks T, Wallace RW. Induction of ICAM-1 by TNF-alpha, IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am J Physiol.* 1992;263(4 Pt 1):C767-72.
62. Hogg N. An integrin overview. *Chem Immunol.* 1991;50:1-12.
63. Santana AN, Ab'Saber AM, Teodoro WR, Capelozzi VL, Barbas CS. Thrombosis in small and medium-sized pulmonary arteries in Wegener's granulomatosis: a confocal laser scanning microscopy study. *J Bras Pneumol.* 2010;36(6):724-30.