

ALEX MAGNO COELHO HORIMOTO

**ANTICORPO ANTI-COLÁGENO TIPO V EM PACIENTES
PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA: CORRELAÇÃO
COM OUTROS AUTOANTICORPOS ESPECÍFICOS, CRITÉRIOS
DE GRAVIDADE E DE ATIVIDADE DA DOENÇA**

**CAMPO GRANDE - MS
2015**

ALEX MAGNO COELHO HORIMOTO

**ANTICORPO ANTI-COLÁGENO TIPO V EM PACIENTES
PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA: CORRELAÇÃO
COM OUTROS AUTOANTICORPOS ESPECÍFICOS, CRITÉRIOS
DE GRAVIDADE E DE ATIVIDADE DA DOENÇA**

Tese submetida ao Programa multi institucional de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor.

Linha de Pesquisa: Doenças emergentes, reemergentes e negligenciadas na região Centro-Oeste: aspectos socioculturais, eco ambientais, epidemiológicos e clínicos.

Orientador: Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari

**CAMPO GRANDE - MS
2015**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE



FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: **ALEX MAGNO COELHO HORIMOTO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANTICORPO ANTI-COLÁGENO TIPO V EM
PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA: CORRELAÇÃO
COM OUTROS AUTOANTICORPOS ESPECÍFICOS, CRITÉRIOS DE
GRAVIDADE E DE ATIVIDADE DA DOENÇA.**

Tese submetida ao Programa multi
institucional de Pós-Graduação em Saúde e
Desenvolvimento da Região Centro Oeste –
Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul, como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do título de Doutor.

RESULTADO: _____ (preenchido pela banca: Aprovado / Reprovado)

CAMPO GRANDE (MS), ____ de _____ de _____

EXAMINADORES:

- Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa, Mestrado em Medicina (Reumatologia) pela Universidade de São Paulo (1985) e Doutorado em Medicina (Reumatologia) pela Universidade de São Paulo (1998) – Presidente. _____

- Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari, Mestrado em Medicina (Reumatologia) pela Universidade de São Paulo (1981), Doutorado em Medicina (Reumatologia) pela Universidade de São Paulo (1986) – Membro Titular. _____

- Prof. Dra. Inês Aparecida Tozetti, Mestrado em Imunologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas (1997) e Doutorado em Ciências, área de concentração em Imunologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (2006) – Membro Titular.

- Prof. Dr. Günter Hans Filho, Mestrado em Medicina (Dermatologia) pela Universidade Federal de São Paulo (1994) e Doutorado em Medicina (Dermatologia) pela Universidade de São Paulo (1999) – Membro Titular. _____

- Prof. Dr. José Lacerda Brasileiro, Mestrado em Cirurgia pela Universidade Federal de São Paulo (2006) e Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste (2013) – Membro Titular. _____

- Prof. Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago, Mestrado em Medicina Tropical pela Fundação Oswaldo Cruz (2000) e Doutorado em Medicina Tropical pela Fundação Oswaldo Cruz (2005) – Membro Suplente. _____

DEDICATÓRIA

Aos meus **pais**, pelo amor e pelo exemplo de vida e honestidade, que me guiaram em todos os caminhos e conquistas.

À minha amada **esposa**, pelo amor incalculável e infinita compreensão, que me serviram de grande apoio e alento nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa**, que doou não somente seu conhecimento e experiência, mas também seu precioso tempo, sendo o principal responsável pela realização do trabalho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari**, pela infinita paciência e perfeccionismo, sendo o principal responsável pela árdua lapidação do trabalho e incentivador do meu aprimoramento científico. Minha gratidão, sempre.

Aos colegas reumatologistas, **Prof.^a Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá** do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP; **Prof.^a Dra. Cristiane Kayser** e **Prof. Dr. Luís Eduardo Coelho Andrade** do Serviço de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP que me acolheram tão bem em seus respectivos Serviços, proporcionando amplas condições para a realização deste trabalho.

Especialmente para as biomédicas **Elenice Mantovani** do Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP e **Silvia Helena Rodrigues** do Laboratório de Imuno-Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP / Hospital São Paulo pela grande contribuição na realização dos autoanticorpos estudados neste trabalho.

A **todos** que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, especialmente os **pacientes**, sem os quais seria impossível alcançar estes objetivos.

Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste**, através de seus professores e funcionários, que possibilitaram a realização de um grande projeto e a concretização de um grande sonho.

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem: Por quê?
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo: Por que não?”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

Introdução: A esclerose sistêmica (ES) é uma enfermidade do tecido conjuntivo de caráter autoimune caracterizada pela tríade de injúria vascular, autoimunidade (celular e humoral) e fibrose tecidual. A observação de que o colágeno V (COLV) é uma molécula oculta entre as fibras heterotípicas e que ocorre deposição deste colágeno com morfologia anômala no tecido cutâneo de pacientes com ES, sugere fortemente que o COLV seja um personagem importante no desencadeamento de autoimunidade, já que poderia suscitar uma resposta específica (COLV e anti COLV), com formação de imunocomplexos e deposição dos mesmos no endotélio vascular, acarretando dano vascular o que permitiria o influxo de células da imunidade inata, ocasionando liberação de enzimas proteolíticas que degradariam as fibras heterotípicas de colágeno, com exposição de mais COLV e perpetuação da enfermidade. **Objetivos:** Avaliar as características sócio demográficas, clínicas e laboratoriais de 60 pacientes com ES do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da FMUFMS e correlacionar a presença do anti COL V com aspectos clínicos e laboratoriais da enfermidade. **Métodos:** Foram selecionados 60 pacientes com diagnóstico de ES que concordaram em participar da pesquisa durante o período de Janeiro a Dezembro de 2013. Durante a entrevista inicial foram coletados dados sócio demográficos e exame clínico, além da dosagem sérica de anti COL V e anticorpos específicos para ES, correlacionando o tipo de autoanticorpo com as manifestações clínicas e laboratoriais encontradas. **Resultados:** Todos os pacientes com ES avaliados preenchiam os novos critérios do ACR/EULAR para diagnóstico da patologia, eram principalmente do sexo feminino (98,3%) e da forma limitada da doença (43,3%), com idade média de 51 anos, cor branca seguida pela parda, com manifestação inicial de fenômeno de Raynaud antes do diagnóstico, tempo de duração da doença médio de 9 anos e escore cutâneo modificado de Rodnan médio de 13,08. Em relação aos antecedentes pessoais, a maioria declarou não ser tabagista (76,7%) e observou-se *diabetes mellitus* em 15% e câncer em 1,7% dos pacientes com ES. As principais manifestações clínicas observadas em cada sistema orgânico dos pacientes foram: espessamento cutâneo nas mãos (78,3%), fenômeno de Raynaud (100%), artrite (33,3%), acometimento de esôfago (71,7%), doença intersticial pulmonar (45%), hipertensão arterial pulmonar (19,4%) e crise renal esclerodérmica (1,7%). As alterações laboratoriais mais significativas foram: elevação de provas inflamatórias em 41,7% dos pacientes (VHS e PCR), elevação de CPK (15%), queda dos fatores do complemento C3 e C4 (3,3%), anticorpo antinuclear (95%), anti centrômero (41,7%), anticorpo anti DNA topoisomerase I (26,7%), anti RNA polimerase III (11,7%), anti U1 RNP (16,7%) e anti Ro (SSA) em 11,7% dos pacientes. O anti COLV foi detectado em 8,3% dos pacientes com ES e apresentou importante correlação estatística com a atividade da doença e com crise renal esclerodérmica, além de tendência à associação com hipertensão arterial pulmonar; no entanto, não se correlacionou com o índice de gravidade da doença ou qualquer outra manifestação clínica, nem com qualquer um dos três anticorpos específicos da ES estudados. **Conclusões:** O anti COLV se correlacionou de forma significativa com a atividade da doença e está provavelmente relacionado com a lesão precoce do complexo endotélio-membrana basal, sendo um bom indicador de necessidade de tratamento naqueles pacientes com positividade para o mesmo.

Palavras-chave: anticorpo anti colágeno V, esclerose sistêmica, anti topoisomerase I, anti centrômero, anti RNA polimerase 3.

ABSTRACT

Introduction: Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease of the connective tissue characterized by the triad of vascular injury, autoimmunity (cellular and humoral) and tissue fibrosis. The observation that type V collagen (COLV) is a hidden molecule between heterotypic fibers and deposition occurs with abnormal morphology of this collagen in the skin of SSc patients, strongly suggests that the COLV is an important character in triggering autoimmunity, since could elicit a specific response (COLV and anti COLV) with immune complex formation and deposition in the vascular endothelium, leading to vascular damage which would allow the influx of cells from innate immunity, causing release of proteolytic enzymes that degrade heterotypical collagen fibers with exposure of more COLV and perpetuation of the disease.

Objectives: To evaluate the socio demographic, clinical and laboratory characteristics of 60 SSc patients from de Department of Rheumatology of the University Hospital Maria Aparecida Pedrossian of FMUFMS and correlate the presence of anti COL V with clinical and laboratory aspects of the disease. **Methods:** We selected 60 patients with ES who agreed to participate in the study during the period from January to December 2013. During the initial interview were collected socio demographic data and clinical examination, in addition to serum anti COL V and specific antibodies ES, correlating the type of autoantibody with the clinical and laboratory manifestations found. **Results:** All patients evaluated ES met the new criteria of the 2013 ACR / EULAR diagnostic pathology, were mostly female (98.3%) and the limited form of the disease (43.3%) with a mean age of 51 years-old white followed by brown, with initial manifestation of Raynaud's phenomenon before diagnosis, the mean disease duration of 9 years and skin score modified Rodnan average of 13.08. Regarding personal history, most stated that being a smoker (76.7%), diabetes mellitus was observed in 15% and cancer in 1.7% of patients with SSc. The main clinical manifestations observed in each organ system of the patients were: skin thickening in the hands (78.3%), Raynaud's phenomenon (100%), arthritis (33.3%), esophageal involvement (71.7%), interstitial lung disease (45%), pulmonary hypertension (19.4%) and scleroderma renal crisis (1.7%). The most significant laboratory abnormalities were: elevation of inflammatory markers in 41.7% of patients (ESR and CRP), elevation of CPK (15%), decrease in complement factors C3 and C4 (3.3%), antinuclear antibody (95%) anti centromere (41.7%), antibody against DNA topoisomerase I (26.7%), anti RNA polymerase III (11.7%), anti U1 RNP (16.7%) and anti Ro (SSA) in 11.7% of patients. The anti COLV was detected in 8.3% of patients with SSc and showed a significant statistical correlation with disease activity and with scleroderma renal crisis, and tendency to association with pulmonary arterial hypertension; however, did not correlate with the severity index of disease or any other clinical manifestations, nor with any of the three specific antibodies ES studied. **Conclusions:** The anti COLV correlated significantly with disease activity and is probably related to the early injury of endothelium-basal membrane complex, being a good indicator of need for treatment in patients with positivity for the same.

Keywords: Antibody anti collagen V, systemic sclerosis, anti topoisomerase I, anti centromere, anti RNA polymerase 3.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos pacientes de acordo com os dados demográficos e classificatórios (n=60).....	53
Tabela 2: Análise comparativa das formas de apresentação clínica da ES sistêmica com dados demográficos e evolutivos da enfermidade (n=60).....	54
Tabela 3: Escalas de <i>sHAQ</i> , de gravidade e de atividade dos pacientes com ES no intervalo de 6 meses.....	55
Tabela 4: Manifestações cutâneas e escore de Rodnan nos pacientes com ES (n=60).....	56
Tabela 5: Frequência de manifestações vasculares em pacientes com ES (n=60)....	58
Tabela 6: Frequência das manifestações musculoesqueléticas em pacientes com ES (n=60).....	59
Tabela 7: Frequência de manifestações gastrointestinais em pacientes com ES (n=60).....	60
Tabela 8: Frequência de alterações gastrointestinais em pacientes com ES, observadas no exame de endoscopia digestiva alta (n=60).....	61
Tabela 9: Frequência de alterações cardiopulmonares em pacientes com ES (n=60).....	63
Tabela 10: Frequência de alterações ecocardiográficas em pacientes com ES (n=60).....	64
Tabela 11: Frequência de envolvimento renal grave em pacientes com ES (n=60)..	65
Tabela 12: Distribuição dos pacientes de acordo com os antecedentes pessoais (n=60).....	66
Tabela 13: Distribuição dos pacientes de acordo com os resultados de exames laboratoriais.....	67
Tabela 14: Distribuição dos pacientes avaliados de acordo com os resultados de autoanticorpos e radiografia das mãos (n=60).....	68
Tabela 15: Distribuição dos pacientes de acordo com a positividade do anticorpo antinuclear (n=60).....	69
Tabela 16: Resultados referentes aos índices de monitoramento em pacientes com	

anti colágeno V positivo ou negativo.....	70
---	----

Tabela 17: Associação entre a pesquisa para o anticorpo anti COL V e o resultado para os anticorpos anticentrômero, anti Scl70 e anti POL 3 (n=60).....	73
---	----

Tabela 18: Distribuição dos pacientes de acordo com o uso de medicamentos (n=60).....	75
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resumo da biossíntese do colágeno.....	26
Figura 2: Características dos colágenos fibrilares.....	27
Figura 3: Mecanismo patogénético da ES proposto pelo LIM-17 do HCFMUSP....	35
Quadro 1: Diagnóstico de ES pelos critérios do ACR / EULAR 2013.....	44
Quadro 2: Critérios diagnósticos de ES pelo ACR de 1980.....	45
Quadro 3: Critérios diagnósticos de ES precoce propostos por LeRoy e Medsger..	46
Quadro 4: Escore cutâneo de Rodnan modificado.....	47
Quadro 5: Critérios de gravidade da ES propostos por Medsger.....	48
Quadro 6: Critérios de atividade de ES propostos por Valentini.....	49
Quadro 7: HAQ (Health Assessment Questionnaire)	50
Quadro 8: sHAQ (Scleroderma Health Assessment Questionnaire)	51
Gráfico 1: Escore na escala de atividade da doença, em pacientes com resultado negativo ou positivo para anti colágeno V.....	71
Gráfico 2: Dispersão ilustrando a correlação linear entre o HAQ e a atividade da doença.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAF1: Anticorpos anti fibrilina 1
AAS: Ácido acetil salicílico
ACA: Anticorpos anticentrômero
ACEs: Anticorpos anti células endoteliais
ACR: Colégio Americano de Reumatologia (do inglês, *American College of Rheumatology*)
AFA: Anticorpos anti fibroblastos
AAN ou FAN: Anticorpo antinuclear
Anti CCP: Anticorpos antipeptídeo citrulinado cíclico
Anti DNA: Anticorpos anti ácido desoxirribonucleico
Anti Jo 1: Anticorpos anti histidil-tRNA sintetase
Anti Ku: Autoanticorpos anti Ku
Anti La (SSB): Anticorpos anti ribonucleoproteína La (SSB)
Anti NOR 90: Anticorpos anti região organizadora de nucléolo
Anti Pm/Scl: Anticorpo anti polimiosite-escleroderma
Anti RNA Pol3 ou anti POL 3: Anticorpos anti RNA polimerase 3
Anti RNP: Anticorpo anti ribonucleoproteína
Anti Ro (SSA): Anticorpos anti ribonucleoproteína Ro (SSA)
Anti Scl 70: Anticorpos anti DNA topoisomerase I
Anti Sm: Anticorpo anti Smith
Anti Th/To: Anticorpos anti ribonucleoproteína Th/To
Anti U3-RNP: anti fibrilarina
APCs: Células apresentadoras de antígenos (do inglês, *antigen-presenting cell*)
AR: Artrite reumatóide
ASIA: Síndrome autoimune / inflamatória induzida por adjuvantes (do inglês, *Autoimmune / autoinflammatory Syndrome Induced by Adjuvants*)
BALB/c: linhagem de camundongo albino gerada em laboratório
BANK1: Proteína estrutural de células B com repetições de anquirina (do inglês, *B-cell scaffold protein with ankyrin repeats*)
BLK: Quinase de linfócito B (do inglês, *B-cell lymphocyte kinase*)
BMPs: Proteínas morfogenéticas do osso (do inglês, *bone morphogenetic proteins*)
BO: Bronquiólite obliterante
C3: Fração C3 do complemento
C4: Fração C4 do complemento
CB2: Receptor canabinóide tipo 2 (do inglês, *cannabinoid receptor type 2*)
CD: Aglomerado de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*)
CD226: Aglomerado de diferenciação 226 (do inglês, *cluster of differentiation 226*)
CD247: Aglomerado de diferenciação 2247 (do inglês, *cluster of differentiation 247*)
CENP: proteínas centroméricas (do inglês, *centromeric proteins*)
COL: Colágeno
COL V: Colágeno tipo V
Cols: colaboradores
CPK: Creatinofosfoquinase
Cr: Creatinina
CRE: Crise renal esclerodérmica

CTGF: Fator de crescimento do tecido conjuntivo (do inglês, *connective tissue growth factor*)

CVF: Capacidade vital funcional pulmonar

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

DITC: Doença indeterminada do tecido conjuntivo

DMTC: Doença mista do tecido conjuntivo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

DRGE: Doença do refluxo gastroesofágico

ECO: Ecocardiograma

EDA: Endoscopia digestiva alta

ELISA: Ensaio imunoenzimático (do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay*)

ENU: Etil nitroso uréia

EPM: Escola Paulista de Medicina

ERK 1/2: Quinase regulada por sinais extracelulares 1 ou 2 (do inglês, *extracellular signal regulated kinase 1/2*)

ERM: Escore de Rodnan modificado

ES: Esclerose sistêmica

ET-1: Endotelina – 1

Ets-1: Proteína oncogene 1 de transcrição específica de eritroblastos (do inglês, *Ets-1 transcription factor*)

EULAR: Liga Europeia Contra o Reumatismo (do inglês, *European League Against Rheumatism*)

FAK: Quinase de adesão focal (do inglês, *focal adhesion kinase*)

FAS: Antígeno de apoptose 1 (do inglês, *apoptosis antigen 1*)

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, *fibroblast growth factor*)

FIP: Fibrose intersticial pulmonar

Fli-1: Fator de integração 1 amigo da leucemia (do inglês, *friend leukemia integration 1 transcription factor*)

FMUFMS: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

FRy: Fenômeno de Raynaud

GvHD: Doença enxerto versus hospedeiro (do inglês, *graft versus host disease*),

HAQ: Questionário de Avaliação em Saúde (do inglês, *Health Assessment Questionnaire*)

HAP: Hipertensão arterial pulmonar

HCFMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HIF-1: Fator 1 indutor de hipóxia (do inglês, *hypoxia inducible factor 1*)

HLA: Antígeno Leucocitário Humano (do inglês, *human leukocyte antigen*)

HSP47: Proteína do choque térmico 47 (do inglês, *heat shock protein 47*)

5-HT: 5 Hidroxitriptamina ou Serotonina

HVE: Hipertrofia de ventrículo esquerdo

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICAM-1: Molécula 1 de adesão intracelular (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*)

IFI: Imunofluorescência Indireta

IFN- γ : Interferon gama

IL: Interleucina

IL-4: Interleucina 4

IRF5: Fator 5 regulador do interferon (do inglês, *interferon regulatory factor 5*)

JAK-2: Janus quinase 2 (do inglês, *janus kinase 2*)
LDL: Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês, *low density lipoproteins*)
LES: Lúpus eritematoso sistêmico
LIM-17: Laboratório de investigação em reumatologia 17
LRP2: Lipoproteína de baixa densidade tipo 2 (do inglês, *low density lipoprotein receptor related protein 2*)
MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos 1 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein 1*)
MEC: Matriz extracelular
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex*)
miR-29: microRNA-29
MMP: Metaloproteinases de matriz (do inglês, *matrix metalloproteinases*)
MTX: Metotrexate
NKT: Linfócitos T exterminadora natural (do inglês, *natural killer T cells*)
NT-ProBNP: porção N-terminal do peptídeo natriurético cerebral (do inglês, *N terminal pro brain natriuretic peptide*)
ON: Óxido nítrico
p53: supressor tumoral p53
PCR: Proteína C reativa
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, *anti platelet derived growth factor*)
PIU: Pneumonia intersticial usual (idiopática)
PM: Placa metafásica
Pm/Scl: polimiosite/escleroderma
PSAP: Pressão estimada na artéria pulmonar
PTPN22: Proteína tirosina fosfatase-22 (do inglês, *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*)
RAS: Vírus do sarcoma de rato (do inglês: *RAt Sarcoma virus*)
RNA: Ácido ribonucleico
RNP: Ribonucleoproteína
ROS: Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)
RPR: Receptores padrão de reconhecimento
Rx: Radiografia
SF-12: Formulário curto de 12 itens para pesquisa em saúde (do inglês, *12-Item Short-Form Health Survey*)
sHAQ: Questionário de Avaliação em Saúde adaptado para esclerodermia (do inglês, *scleroderma Health Assessment Questionnaire*)
Smads: Proteínas intracelulares transdutoras (do inglês, *Drosophila protein, mothers against decapentaplegic - MAD e Caenorhabditis elegans protein - SMA*)
STAT 4: Ativador de Transcrição e Transdutor de Sinal do Tipo 4 (do inglês, *signal transducers and activators of a transcription type 4*)
TBX21: Fator 21 de transcrição T-box (do inglês, *T-box transcription factor 21*)
TCAR: Tomografia computadorizada de alta resolução
TGF- β : Fator de crescimento e transformação beta (do inglês, *transforming growth factor beta*)
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*)
TNF AIP3: Proteína 3 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alpha induced protein 3*)

TNF SF4: Membro 4 da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor alpha superfamily type 4*)

TLRs: Receptor tipo Toll (do inglês, *Toll-like receptor*)

Tregs: Linfócitos T regulatórios (do inglês, *regulatory T cells*)

TSK-1: camundongo de pele espessa tipo 1 (do inglês, *tight skin 1*)

UCD-200: Linhagem de galinhas da Universidade da Califórnia campus Davis

UD: Úlceras digitais

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

U1-RNP: Anticorpo anti U1 ribonucleoproteína

U3-RNP: Anticorpo anti U3 ribonucleoproteína

VCAM-1: Molécula 1 de adesão da célula vascular (do inglês, *vascular cell adhesion protein 1*)

VE: Ventrículo esquerdo

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor*)

VHS: Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

Folha de aprovação.....	i
Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Epígrafe.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de tabelas.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas e siglas.....	x
Sumário.....	xiv
1 – Introdução.....	1
1.1 Considerações gerais da Esclerose Sistêmica.....	1
1.2 Etiologia da Esclerose Sistêmica.....	2
1.2.1 Genética da Esclerose Sistêmica.....	2
1.2.2 Fatores Ambientais e Infecciosos.....	4
1.3 Etiopatogenia da Esclerose Sistêmica.....	6
1.3.1 Vasculopatia inicial.....	6
1.3.2 Autoimunidade.....	10
1.3.3 Fibrose tecidual.....	13
1.4 Autoanticorpos em Esclerose Sistêmica.....	16
1.5 Modelos experimentais de Esclerose Sistêmica.....	21
1.6 Modelo de Esclerose Sistêmica Induzido por meio da imunização com colágeno tipo V.....	23
1.7 Colágeno tipo V.....	24
1.8 Autoimunidade e colágeno V.....	28
1.9 Justificativa do estudo.....	32
2 – Objetivos.....	36
2.1 Geral.....	36
2.2 Específicos.....	36
3 – Pacientes e Metodologia.....	37
3.1 Descrição do estudo.....	37
3.2 Seleção dos pacientes.....	37
3.3 Coleta dos dados.....	38
3.4 Amostras de soro dos pacientes.....	39
3.5 Pesquisa de autoanticorpos.....	40
3.6 Análise estatística.....	43
3.7 Instrumentos de Avaliação.....	43
3.7.1 Critérios de classificação do ACR / EULAR 2013 para diagnóstico de ES.....	43
3.7.2 Critérios diagnósticos de ES pelo American College of Rheumatology.....	45
3.7.3 Critérios diagnósticos de ES precoce propostos por LeRoy e Medsger.....	46
3.7.4 Escore cutâneo de Rodnan modificado.....	47

3.7.5 Critérios de gravidade da ES.....	48
3.7.6 Critérios de atividade da ES.....	49
3.7.7 HAQ (<i>Health Assessment Questionnaire</i>).....	50
3.7.8 <i>Scleroderma Health Assessment Questionnaire (sHAQ)</i>	51
4 – Resultados	52
4.1 Dados demográficos e classificatórios.....	52
4.2 Índices de monitoramento.....	55
4.3 Manifestações cutâneas.....	56
4.4 Manifestações vasculares.....	57
4.5 Manifestações musculoesqueléticas.....	58
4.6 Manifestações gastrintestinais.....	60
4.7 Manifestações cardiopulmonares.....	62
4.8 Manifestações renais.....	65
4.9 Antecedentes pessoais.....	65
4.10 Exames laboratoriais.....	66
4.11 Anticorpo antinuclear, anticorpo anti colágeno V e anticorpos específicos de ES.....	69
4.12 Medicamentos em uso.....	74
4.13 Grupo controle.....	75
4.14 Principais observações com significância estatística.....	76
5- Discussão	78
5.1 Características demográficas dos pacientes com ES.....	78
5.2 Manifestações clínicas dos pacientes com ES.....	80
5.3 Associação de neoplasia em paciente com ES.....	84
5.4 Alterações laboratoriais observadas em pacientes com ES.....	85
5.5 Análise do anticorpo anti COL V em 60 pacientes com ES do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Ap. Pedrossian da FMUFMS.....	89
6 – Conclusões	101
7 – Referências Bibliográficas	102
8 – Apêndices	135
Apêndice A: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	135
Apêndice B: Ficha de avaliação clínica.....	139
9 – Anexos	142
Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	142
Anexo B: Trabalhos aprovados na Revista Brasileira de Reumatologia.....	146
Anexo C: Classificação Qualis da Revista Brasileira de Reumatologia.....	149

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais da esclerose sistêmica

A esclerose sistêmica (ES) é uma enfermidade do tecido conjuntivo de caráter autoimune, extremamente heterogênea na sua apresentação clínica, com acometimento de vários sistemas e segue um curso variável e imprevisível ⁽¹⁾. Sua etiologia permanece desconhecida, sendo sugerida uma causa multifatorial, possivelmente desencadeada por fatores ambientais em um indivíduo geneticamente predisposto ⁽²⁾.

Um dos aspectos distintivos da ES é a microvasculopatia, acompanhada de ativação de fibroblastos e excessiva produção de colágeno ⁽³⁾. Trata-se de patologia única ao exibir características de três processos fisiopatológicos distintos: consiste na tríade de injúria vascular, autoimunidade (celular e humoral) e fibrose tecidual, levando a acometimento cutâneo além de diversos órgãos internos como pulmão, coração, trato gastrointestinal entre outros ^(3, 4).

A ES é observada predominantemente em mulheres negras com pico de incidência entre 45 a 64 anos de idade ⁽³⁾. Está bem documentada a preponderância feminina na ES, com taxas que variam de 3:1 a 8:1 ⁽³⁾, no entanto, quando estudados pacientes com ES que tinham histórico de exposição à sílica, observou-se alta prevalência entre homens ⁽⁵⁾.

Nos Estados Unidos, a taxa de prevalência reportada para a ES foi de 1 a 5 por 1000 habitantes. Dois estudos de prevalência realizados na Inglaterra encontraram uma taxa similar, de cerca de 1 paciente para cada 1000 habitantes ^(2, 6). Com relação à incidência da ES, estima-se uma taxa anual de 0,6 a 19 casos novos para cada milhão de habitantes ⁽⁷⁾. Outros autores encontraram taxa de incidência da ES de 3,8 a 13,9 novos casos por milhão de habitantes ao ano ⁽⁸⁾. Não dispomos de dados de prevalência e incidência da doença no Brasil.

A classificação dos pacientes com ES leva em conta a extensão de envolvimento da pele e a presença de sobreposição com determinadas características de outras doenças reumatológicas autoimunes ^(7, 8, 9). Consideram-se 4 subtipos da doença:

- Esclerose sistêmica difusa: endurecimento cutâneo grave e difuso. Tipicamente associada à presença do anticorpo anti topoisomerase I ou do anticorpo anti RNA polimerase III;

- Esclerose sistêmica limitada: envolvimento cutâneo limitado às extremidades distais e à face. Mais comumente associada à presença do anticorpo anticentrômero;
- Esclerose sistêmica *sine scleroderma*: pacientes com características vasculares, fibróticas ou autoimunes sorológicas da doença, mas que não apresentam esclerose cutânea estabelecida;
- Esclerose sistêmica em síndromes de superposição: características encontradas em pacientes com ES forma limitada ou difusa em associação com uma ou mais doenças reumáticas autoimunes distintas. Frequentemente associada à presença de anticorpo anti U1 ribonucleoproteína (U1-RNP), anticorpo anti U3 ribonucleoproteína (U3-RNP) ou polimiosite-escleroderma (Pm/Scl).

Ademais, descrevem-se formas de esclerodermia cutânea, em que a lesão localiza-se em regiões restritas da pele e não ocorre envolvimento sistêmico ou visceral. A forma mais comum de esclerodermia é em placas ou morfêia, com a presença de lesões mais comumente circulares e em tamanho e número variado. Observam-se ainda, entre outras formas, as lineares ou em golpe de sabre, que acometem a face ou membros. No entanto, não são classificadas dentro do espectro da ES ⁽⁷⁾.

1.2 Etiologia da esclerose sistêmica

1.2.1 Genética da esclerose sistêmica

O componente genético das doenças autoimunes é revelado pelo risco aumentado do desenvolvimento de uma doença autoimune observado em gêmeos e irmãos do indivíduo afetado ^(10, 11). A ES não é primariamente uma desordem genética, mas geralmente considera-se que a enfermidade realmente tenha uma propensão genética através de relatos de gêmeos homozigóticos que tinham concordância para a doença ⁽¹²⁾. Em 1953 Rees e Bennett descreveram esclerodermia localizada em pai e filha, seguindo-se várias publicações de esclerodermia familiar em diferentes populações e relações intrafamiliares ^(12, 13). Uma história familiar positiva representa o maior fator de risco já identificado para o desenvolvimento da ES ^(14, 15). No entanto, a baixa frequência na taxa de concordância das doenças autoimunes entre irmãos quando comparada àquela entre gêmeos monozigóticos, suporta a presença de múltiplos genes contribuindo para a predisposição genética, incluindo a ES ⁽¹⁶⁾.

Além disso, têm sido relatadas associações entre HLA e a ES ^(12, 15, 17, 18). A região dos genes do HLA é um exemplo claro de polimorfismo genético no desenvolvimento de ES ⁽¹⁵⁾. Estudos de associação do HLA classe II com ES foram muito inconsistentes quando agrupados por raça ou etnia ^(15, 18). Contudo, quando os pacientes com ES foram agrupados de acordo com o perfil de autoanticorpos de cada paciente, os achados foram consistentes entre grupos étnicos diferentes ⁽¹⁵⁾. Por exemplo, haplótipos HLA-DRB1*01 – DQB1*0501 são mais comuns em pacientes com ES positivos para anticorpo anticentrômero enquanto haplótipos HLA-DRB1*11 – DQB1*0301 têm sido associados com a positividade dos anticorpos anti-topoisomerase I ⁽¹⁸⁾.

Mais recentemente uma revisão a respeito de estudos de fatores genéticos que promovam o desenvolvimento da ES encontrou evidências para a contribuição de diversos genes ou *loci* na patogênese da ES, com base em um fundo genético de autoimunidade compartilhado com outras doenças autoimunes ^(18, 19). Os genes relacionados com autoimunidade e associados com susceptibilidade à ES, bem como ao desenvolvimento de certos fenótipos específicos da doença, quando acometidos por alterações ou mutações, seriam: STAT4, IRF5, TBX21, PTPN22, BANK1, BLK, CD247, TNFAIP3, CD226, TNFSF4 e FAS ⁽¹⁸⁾.

Verificou-se ainda que genes relacionados com a deficiência de complemento, particularmente dos alótipos de C4, estão associados ao desenvolvimento de ES forma limitada, bem como na forma difusa com e sem anticorpos anti-topoisomerase I ⁽²⁰⁾.

Os genes relacionados com o desencadeamento de autoimunidade parecem desempenhar um papel principal na patogênese da ES, enquanto pouco se sabe sobre os fatores genéticos envolvidos com a vasculopatia e fibrose ⁽¹⁸⁾. Polimorfismos genéticos variados estão envolvidos com a predisposição ao desenvolvimento de fibrose na ES, alterando diversos fatores, tais como fator de crescimento e transformação beta, fator de necrose tumoral alfa, fibrilina I, fibronectina, colágeno tipo I, interleucina 1 e 8 ⁽²¹⁾, bem como fator de crescimento do tecido conjuntivo e receptor de serotonina 5-HT2A ⁽¹⁸⁾. Por outro lado, os fatores genéticos que predispõe ao desencadeamento da vasculopatia observada na ES, ocasionariam mudanças nos seguintes fatores: enzima conversora de angiotensina, óxido nítrico sintetase de origem endotelial ⁽²¹⁾, endoglinta, fator 1 derivado de células do estroma, fator 1A induzível por hipóxia, receptor do ativador do plasminogênio uroquinase, fator de crescimento vascular endotelial, fibrinogênio, endotelina 1 e seus receptores ⁽¹⁸⁾.

Existem evidências que corroboram a ideia de que a complexidade da ES parece

representar mais uma coleção de fenótipos do que uma entidade única de doença. Deste modo, estas associações genéticas podem na realidade estarem relacionadas com distintos fenótipos na ES baseado em um padrão de autoanticorpos ⁽¹⁵⁾.

Hudson e colaboradores utilizaram o termo caleidoscópio de autoimunidade em pacientes com ES para descrever o fato de que mais de uma doença autoimune diferente pode coexistir em um único paciente (poliautoimunidade) ou no mesmo núcleo familiar (autoimunidade familiar) ⁽²²⁾. A alta prevalência de poliautoimunidade (38%) e também de autoimunidade familiar (36%) em pacientes com ES, reforça a ideia de que fenótipos autoimunes clinicamente distintos podem dividir variantes comuns de susceptibilidade ⁽²²⁾.

Contrariamente, Maddison e cols encontraram a prevalência de anticorpos antinucleares (ANA) em 27% dos parentes dos pacientes com ES, mas também em 24% dos cônjuges dos pacientes ⁽²³⁾. A pesquisa de ANA em pacientes com ES, seus parentes e cônjuges, foi repetida por outros autores com resultados distintos, sugerindo que ambos os fatores, genético e ambiental, influenciam a autoimunidade na ES ^(14, 17).

1.2.2 Fatores Ambientais e Infeciosos

Aparentemente, o desenvolvimento de uma doença autoimune é altamente dependente de um antecedente genético favorável e permissivo, mas outros fatores desencadeantes tais como vírus, bactérias e substâncias químicas levam a uma alteração na auto reatividade e perda da tolerância imunológica ⁽²⁴⁾. As infecções virais são as principais candidatas a fatores ambientais na promoção de doenças autoimunes, devido a sua capacidade de desencadear uma vigorosa ativação imune e induzir doenças autoimunes em modelos animais ⁽²⁵⁾.

Maul e cols clonaram e sequenciaram o principal epítipo do antígeno marcador de esclerose sistêmica difusa (topoisomerase 1) e encontraram na proteína uma sequência de aminoácidos que é similar a proteína retroviral p30^{gag}, sugerindo que um agente retroviral poderia estar envolvido na patogênese da ES ⁽²⁶⁾. Posteriormente, observou-se igualmente uma homologia de estrutura entre uma proteína do citomegalovírus (UL 70) e o DNA topoisomerase I humano, alvo clássico da resposta imune na ES ⁽²⁷⁾.

Adicionalmente, sugere-se ainda a infecção de células endoteliais e fibroblastos

por parvovírus B19 como possível papel patogênico no desencadeamento de ES, através do encontro de sorologia específica viral em 9 de 12 pacientes com ES, bem como de DNA de parvovírus B19 em pele e medula óssea de 3 pacientes e nenhum controle ⁽²⁸⁾.

De forma semelhante, Gavanescu e cols sugerem a forte ligação entre infecção e autoimunidade, ao demonstrarem que a infecção experimental por *Mycoplasma* induziu uma resposta semelhante à esclerodermia em camundongos, com formação de autoanticorpo anticentrômero e o tratamento dos camundongos com antibióticos preveniu o desenvolvimento de autoanticorpos ⁽²⁹⁾.

O desenvolvimento de esclerodermia ou condições semelhantes à esclerodermia (*escleroderma-like*) em associação com vários agentes tóxicos incluindo sílica, silicone, cloreto de vinil, solventes industriais e óleo de couza, corrobora a possibilidade de fatores ambientais como causa da patologia ^(5, 17, 27).

Desde a década de 80 diversos relatos de casos e séries de casos descrevem uma associação entre implante mamários de silicone e o surgimento de doenças autoimunes, particularmente a ES ⁽³⁰⁾. Uma revisão de 1992 demonstrou que o teste de imunofluorescência para identificar anticorpos antinucleares foi positivo em ampla proporção (7 a 68%) de pacientes com implantes de silicone e nestes pacientes *escleroderma-like*, encontrou-se a presença dos anticorpos anticentrômero e anti Pm/Scl ⁽³¹⁾. Muito recentemente foi descrita a síndrome de incompatibilidade de implante de silicone e de outros materiais como uma causa frequente de síndrome de Shoenfeld ou ASIA (síndrome autoimune/inflamatória induzida por adjuvantes) e postula-se que os silicones ao migrarem por micro rupturas de sua cápsula, são capturados por macrófagos, resultando na ativação destas células ^(32, 33). Outro mecanismo proposto seria a ocorrência de oxidação dos silicones, com formação local de sílica, os quais são transportados aos linfonodos regionais, resultando em pronunciado efeito adjuvante e desencadeando doenças autoimunes e imunodeficiências ^(32, 33).

Finalmente, o microquimerismo é um terceiro mecanismo proposto para explicar a patogênese da ES, no qual células alogênicas fetais ou maternas cruzam a placenta durante a gestação em um tráfego bidirecional e persistem na circulação e em tecidos da mãe e feto, respectivamente ^(34, 35). Estas células não próprias enxertadas poderiam tornar-se ativadas por um segundo evento, mesmo após várias décadas, desencadeando uma reação semelhante a de enxerto versus hospedeiro, que se manifesta como ES ^(34, 35). Os estudos que apoiam esta teoria se baseiam no encontro de células fetais na circulação de mulheres normais muitos anos após a gestação e DNA fetal foi encontrado em amostras de pele de mulheres com ES que

havia estado previamente gestantes de um feto masculino⁽³⁴⁾. Ademais, existem várias características da ES que são compartilhadas por pacientes com doença enxerto versus hospedeiro crônica, como endurecimento progressivo da pele, bem como acometimento de intestino e pulmões⁽³⁵⁾.

1.3 Etiopatogenia da esclerose sistêmica

1.3.1 Vasculopatia inicial

A etiopatogenia da ES pode ser iniciada na vasculatura, com evidências sugerindo que algumas alterações morfológicas e desregulação do controle do tonus vascular podem estar aparentes antes do desenvolvimento da doença, sendo o fenômeno de Raynaud a manifestação clínica mais precoce da doença^(36, 37). Os eventos patológicos subsequentes na ES podem incluir comunicação prejudicada entre células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos, ativação de linfócitos, produção de autoanticorpos, inflamação e fibrose do tecido conjuntivo⁽³⁶⁾. Estes eventos resultam em um acúmulo de constituintes da matriz extracelular (MEC), que substitui a arquitetura tecidual habitual⁽³⁶⁾. A produção excessiva de diversos componentes do tecido conjuntivo normalmente presentes na derme é um achado característico na pele de pacientes com ES⁽³⁸⁾. Os principais componentes da MEC que se depositam excessivamente na pele são os colágenos tipo I, III e V^(38, 39), mas também os colágenos tipo VI e VII⁽³⁹⁾ bem como proteoglicanos e fibronectina⁽³⁸⁾.

Os acontecimentos mais precoces observados na patogênese da ES são o dano às células endoteliais e apoptose, demonstrados na pele⁽³⁷⁾ e pulmões⁽⁴⁰⁾ muito antes de qualquer evidência de fibrose tecidual. A presença de células endoteliais circulantes observadas em pacientes com ES poderia representar evidência direta de injúria endotelial e a detecção de progenitores endoteliais circulantes poderia representar uma resposta à isquemia vascular que ocorre na ES precoce, numa tentativa de revascularização⁽⁴¹⁾. O endotélio é um tecido dinâmico atuando em múltiplas funções biológicas através da produção de diversos reguladores, tais como vasodilatadores (óxido nítrico e prostaciclina), vasoconstritores (endotelina 1 e fator ativador de plaquetas), e moléculas de adesão (selectinas, integrinas)⁽³⁷⁾. Num estágio precoce de ES, as células endoteliais ativadas expressam grande número de

moléculas de adesão ^(37, 42). Ademais, foi observado após ativação endotelial na ES, um desbalanço na secreção de vasodilatadores e vasoconstritores, bem como ativação crônica de plaquetas e de vias fibrinolíticas ^(37, 43, 44).

O óxido nítrico (ON) atenua a síntese de colágeno tipo I em fibroblastos da derme humana de indivíduos saudáveis, mas esta regulação é perdida em fibroblastos de pacientes com ES ⁽⁴⁵⁾. Outros estudos sugerem que o ON pode atuar diretamente na inibição da síntese do colágeno pela hidroxilação da prolina, estimulação das metaloproteinases, redução na produção de TGF- β , indução da apoptose de fibroblastos e neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) com atividade pró-fibróticas ^(46, 47). Foi encontrada uma associação entre aumento dos níveis séricos de ON com elevação da pressão estimada na artéria pulmonar, com aumento na gravidade da doença ⁽⁴⁸⁾. Por outro lado, a endotelina 1 (ET-1) desempenha um papel principal na vasoconstrição, além de ativar a expressão da molécula de adesão ICAM-1 em fibroblastos normais e de pacientes com ES, bem como contribuir com a fibrilogênese por contribuir com a ação pró-fibrótica de TGF- β ⁽⁴²⁾. Estudo clínico demonstrou aumento plasmático e ainda nos fluidos obtidos em lavado broncoalveolar de ET-1 em pacientes com ES, sendo os maiores níveis de ET-1 correlacionados com a gravidade da doença e fibrose pulmonar ⁽⁴²⁾. Mais ainda, autoanticorpos funcionais contra receptores vasculares, como anti receptor tipo A de ET-1 e anti receptor tipo 1 de angiotensina II, foram descritos em pacientes com ES e houve associação positiva entre os maiores níveis de ambos autoanticorpos e manifestações mais graves da doença, incluindo hipertensão pulmonar e úlceras digitais ⁽⁴⁹⁾. Adicionalmente, os maiores níveis destes autoanticorpos estiveram associados com aumento na mortalidade ⁽⁴⁹⁾. Experimentos *in vitro* demonstraram que ambos anticorpos estimularam diretamente a fosforilação de quinase extracelular ERK1/2 e aumentaram a expressão da citocina pró-fibrótica TGF- β ⁽⁴⁹⁾.

Vários estudos suportam evidências de ativação plaquetária na ES ^(43, 44, 50, 51, 52). O dano ao endotélio vascular ocasiona exposição do subendotélio, o que propiciaria adesão e agregação plaquetária, que parece preceder o aparecimento das lesões vasculares proliferativas. As plaquetas desempenham um papel fundamental no controle da hemostasia principalmente por se ligarem ao colágeno subendotelial através da integrina e glicoproteína IV, logo após lesão vascular, desse modo iniciando a formação do trombo e contribuindo para a microangiopatia observada na ES ⁽⁵⁰⁾. A integridade da função endotelial é necessária para inibir a agregação plaquetária, sobretudo através da produção de prostaciclina, bem como a heparina e trombomodulina presentes na superfície endotelial, auxiliam na inibição da

trombina plaquetária⁽⁴³⁾. Uma das características da vasculopatia associada com ambas formas da ES é a ativação plaquetária, o qual contribui para a ocorrência de doença arterial oclusiva pela liberação de fatores de crescimento^(43, 44), dentre eles os fatores de crescimento de fosfolipídios (ácido lisofosfatídico e fosfato I esfingosina)⁽⁴⁴⁾ e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)^(51, 52). Diversas citocinas e seus receptores estão expressos nas lesões observadas na ES e podem contribuir com a ativação de fibroblastos, como a endotelina 1 derivada do endotélio disfuncional e o PDGF derivado da ativação plaquetária^(51, 52). Recentes estudos sugerem que a fibrose tecidual na ES é impulsionada por autoanticorpos estimulatórios contra receptores do PDGF, que estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio e colágeno pelos fibroblastos⁽⁵¹⁾, embora essa estimulação possa acontecer independentemente da presença destes autoanticorpos⁽⁵²⁾.

Deste modo, evidência acumulada sugere que a microangiopatia, com perda progressiva de capilares, levaria a uma diminuição do fluxo sanguíneo, seguindo-se uma falta de nutrientes e hipóxia tecidual⁽⁵³⁾. Na doença avançada, a fibrose da pele e múltiplos órgãos internos é a característica histopatológica mais marcante da ES, e resulta de produção exacerbada de MEC por fibroblastos ativados. Como o acúmulo de MEC aumenta a distância da difusão dos vasos sanguíneos para as células, ocorre má nutrição tecidual e hipóxia, contribuindo num ciclo vicioso para fibrose⁽⁴⁾.

Com a progressão da doença, vasos perdem sua elasticidade, ocorre fibrose das camadas media e adventícia, além de oclusão de pequenas artérias que, juntamente com ativação e agregação plaquetária, favorecem os eventos trombóticos com complicações orgânicas importantes, representadas por ulceração digital, hipertensão pulmonar e crise renal esclerodérmica⁽³⁷⁾. A morfologia capilar anormal, observada *in vivo* através da capilaroscopia, é seguida pela perda ou deleção de capilares, numa clara evidência de que um desequilíbrio no processo de angiogênese não permite a regeneração de microvasos funcionais^(4, 37). Paradoxalmente, existe uma expressão aumentada de grande número de fatores pró-angiogênicos, tais como VCAM-1, PDGF, TGF- β , selectinas, ET-1, molécula de adesão intercelular 1 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)^(4, 37, 53, 54). No entanto, comprometimento da angiogênese, da vasculogênese e apoptose de células endoteliais maduras são os mecanismos responsáveis pelas anormalidades microvasculares na ES^(37, 53). Ademais, a tortuosidade e formação de arbustos capilares identificados na capilaroscopia podem ser interpretados como uma tentativa inútil de construir novos vasos após estimulação com fatores angiogênicos, uma vez que a prolongada expressão de VEGF, entre outros

fatores, é deletéria e ocasiona a fusão descontrolada de vasos com formação de uma rede vascular caótica ^(37, 53). A partir de hipóxia crônica gerada por rede capilar deficitária, observa-se a secreção de fator 1 indutor de hipóxia (HIF-1), o qual ativa a transcrição de genes que codificam fatores de crescimento angiogênicos, perpetuando o ciclo de hipóxia tecidual crônica ^(4, 54).

Manalo e cols detectaram em modelos experimentais um grande número de genes codificadores de colágeno ou de enzimas modificadoras de colágeno que foram induzidas pelas células endoteliais pulmonares após 24 horas de hipóxia. Estes genes incluíam colágeno (COL)1A2, COL 4A1, COL 4A2, COL 5A1, COL 9A1 e COL 18A1, além de procolágeno prolil hidroxilase 1 e 2 (P4HA1 e P4HA2), lisil oxidase e lisil hidroxilase ⁽⁵⁴⁾. Estes achados poderiam indicar que a hipóxia poderia promover produção de MEC e estaria ativamente envolvida na patogênese de desordens pró-fibróticas como a ES ⁽⁴⁾.

Com relação à hipertensão pulmonar na ES, pode ocorrer também uma sequência de eventos a partir da disfunção endotelial inicial, que culmina com vasoespasmo, remodelação vascular e predisposição à trombose em pequenos vasos pulmonares, associado a um aumento nos níveis circulantes de endotelina 1 ⁽⁵⁵⁾.

Estudos de necropsia demonstraram que o comprometimento cardíaco ocorreu em até 81% dos pacientes com ES ⁽⁵⁶⁾. Nos pacientes sem lesões coronárias significantes, observou-se frequentemente uma fibrose miocárdica desigual em ambos os ventrículos, resultante de deposição excessiva de colágeno em áreas de necrose dos miócitos. A presença de bandas de necrose sugere a ocorrência de distúrbios na microcirculação, sendo atribuídos ao fenômeno de Raynaud intramiocárdico ^(56, 57). O principal envolvimento cardíaco na ES, caracterizado por arritmias, distúrbios de condução e disfunção ventricular esquerda, poderia ser explicado pelas alterações microvasculares ^(57, 58).

Embora a característica principal da ES seja o comprometimento microvascular, tem sido descrito um aumento na prevalência de doença macrovascular, a partir de relatos de doença arterial periférica distal com alta frequência de estenose e oclusões das artérias digitais dos pacientes com ES. Além dos fatores de risco cardiovascular tradicionais observados na população geral, outros fatores de risco são observados na ES, tais como o aumento da lipoproteína (a) em ambas as formas da doença, anticorpos anti colesterol LDL oxidado, particularmente na ES difusa, anticorpos anti-células endoteliais em 22 a 85% dos pacientes com ES, bem como a prevalência de anticorpos anticardiolipina e anti beta 2 glicoproteína I em 0 a 40% destes pacientes ⁽⁵⁹⁾. Finalmente, trabalho recente demonstrou o COL V como um

autoantígeno na doença arterial coronariana em humanos e ponderou que a autoimunidade ao COLV poderia ser uma característica consistente na aterosclerose em humanos e camundongos, dependente de IL-17 ⁽⁶⁰⁾. Em estrias lipídicas, camadas paralelas de colágenos intersticiais condensados separavam células endoteliais dos depósitos de lípidos extracelulares e o COLV foi encontrado no espaço intercelular da camada íntima dos vasos, além da membrana basal de células endoteliais e de células muculares lisas da íntima e média ⁽⁶¹⁾.

1.3.2 Autoimunidade

O elo entre o envolvimento vascular inicial e a consequência final da doença (fibrose tecidual) poderia ser representado pela autoimunidade. Anticorpos circulantes, alteração de mediadores imunológicos e infiltração de células mononucleares em órgãos afetados representam um argumento positivo na hipótese em que a disfunção do sistema imune conduz a patologia ^(36, 62).

Ambos os sistemas imunológicos inato e adaptativo tem um papel na patogênese da ES ⁽¹⁾. Na resposta imune inata contra agentes infecciosos, em indivíduos normais, as células imunológicas reconhecem os patógenos através dos receptores padrão de reconhecimento (RPR) ⁽⁶²⁾. Os principais RPR são denominados *toll-like receptors* (TLRs) e controlam a resposta imune através da detecção de antígenos moleculares comuns ⁽⁶²⁾. A associação de certas exposições químicas com doenças semelhantes a ES fornece apoio para a noção de que uma resposta imune inata contra antígenos não específicos poderia causar a ES ^(5, 62). A ativação dos TLRs em células dendríticas, monócitos/macrófagos e células B estimulam a produção de citocinas inflamatórias, apresentação de antígenos e desenvolvimento da resposta imune adaptativa ⁽⁶²⁾.

Os interferons são citocinas fundamentais envolvidas na resposta imune inata e adaptativa, além de sua conhecida função imunomoduladora, eles inibem a produção de colágeno ⁽⁶³⁾. Os interferons produzidos após estimulação de TLRs nas doenças autoimunes, poderiam auxiliar na diferenciação e ativação de imaturas células dendríticas a maduras, que são responsáveis pela ativação de células T e células B produtoras de autoanticorpos ⁽⁶³⁾.

Corroborando a hipótese da participação da imunidade inata no desenvolvimento da ES, observou-se uma função anormal nas células *natural killer* de pacientes com ES,

caracterizadas por atividade de citotoxicidade reduzida por diminuição da liberação de granzima B e produção alterada de citocinas, como elevação de IL5, IL6 e IL10 em pacientes com a forma difusa da doença ⁽⁶⁴⁾.

Por outro lado, linfócitos T ativados são detectados na circulação e nos órgãos acometidos (pele e pulmões) de pacientes com ES. Na circulação, níveis de receptores solúveis para IL-2 correlacionam com a extensão da fibrose cutânea e existe evidência para a expansão clonal de linfócitos T ⁽³⁶⁾. Outro estudo demonstrou que a migração transendotelial de linfócitos T CD4⁺ está aumentada na ES, estas células migratórias exibem um fenótipo ativado e podem contribuir para a formação de um típico infiltrado perivascular linfocítico cutâneo ⁽⁶⁵⁾. Observou-se ainda que um grupo substancial de pacientes com esclerodermia exibe um desequilíbrio numérico das células supressoras, caracterizado por redução dos linfócitos T regulatórios ⁽⁶⁶⁾.

A ativação dos linfócitos T e sua secreção de citocinas participam de forma marcante na gênese do dano vascular e da desregulação da síntese do colágeno ⁽⁶⁷⁾. Na circulação sanguínea de pacientes com ES, a proporção dos linfócitos T ativados está aumentada e o impacto tissular desta ativação linfocitária, em particular sobre as células endoteliais, se traduz por uma toxicidade direta *in vitro* e *in vivo* ⁽⁶⁸⁾.

Sabe-se que os linfócitos T regulatórios (Tregs) desempenham um papel importante na modulação de respostas alérgicas e autoimunidade. Estudo recente demonstrou uma redução quantitativa das células T regulatórias, além de redução dos níveis séricos de TGF- β e IL-10 em pacientes com ES e morféia. A diminuição dos Tregs e citocinas imunoregulatórias poderiam levar à indução de autoimunidade e, conseqüentemente, o desenvolvimento de lesões cutâneas ⁽⁶⁹⁾. Embora o papel das Tregs em suprimir a produção de autoanticorpos ainda não esteja claro, observou-se que deficiência na função das Tregs poderia explicar a presença de células T reativas ao colágeno tipo V e também autoanticorpos observados em fibrose pulmonar ⁽⁷⁰⁾.

Posteriormente, descrevem-se defeitos seletivos na frequência e secreção de citocinas pelas células NKT (um subtipo especializado de células T CD4⁺), em várias doenças autoimunes incluindo ES ⁽⁷¹⁾. Sugere-se que, como outras células T regulatórias, as células NKT poderiam desempenhar uma função geral de supressão da autoimunidade, uma vez que a redução acentuada da frequência destas células foram observadas em humanos com ES ⁽⁷¹⁾.

Recentemente, Ueda-Hayakawa e cols descreveram a importante participação de

um subtipo de célula T, caracterizado por expressar o receptor γ/δ de célula T, no desencadeamento da fibrose através de um aumento na expressão das cadeias alfa 2 do colágeno I em fibroblastos, sem contato celular direto ⁽⁷²⁾. Camundongos deficientes do subtipo γ/δ de célula T, apresentaram aumento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina ⁽⁷²⁾. Outros artigos sugeriram que as células T γ/δ são a principal fonte de IL-17, citocina envolvida diretamente no desenvolvimento de fibrose em ES ^(68, 73).

Em adição a sua função bem conhecida de síntese de anticorpos, os linfócitos B podem atuar como apresentadores de antígenos aos linfócitos T ⁽⁷⁴⁾. Linfócitos T e B são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção de tolerância, como ilustrado pela observação que alterações na sinalização de células B resultam em autoimunidade ⁽⁷⁵⁾. O importante papel dos linfócitos B na patogênese da ES pode ser imputado a achados de sinalização anormal de células B em modelos experimentais, onde se observou que defeitos funcionais nos linfócitos B causados pela perda de CD19 (uma molécula de superfície específica de células B) acarretaram em diminuição significativa da fibrose cutânea em camundongos ^(76, 77). Os mesmos autores demonstraram que a depleção de linfócitos B durante o estágio inicial da doença suprimiu a fibrose tecidual, indicando que as células B contribuem para a iniciação da patogênese da ES em camundongos, mas não foram exigidos para a manutenção da doença ⁽⁷⁸⁾. Tanto pacientes com ES quanto camundongos *tight-skin*, um modelo genético de ES, apresentam anormalidades intrínsecas em células B caracterizadas por ativação crônica destas células ^(78, 79).

A presença de linfócitos B também tem sido observada na biópsia de pele de pacientes com ES ⁽⁷⁵⁾, além disso, grupos de genes caracteristicamente encontrados em linfócitos B, alguns dos quais associados com síntese de MEC, foram altamente expressos no tecido de pacientes com ES quando comparado aos controles saudáveis ^(75, 80). Recentemente foi relatado que os linfócitos B são proeminentes nos infiltrados linfocíticos observados na doença intersticial pulmonar de pacientes com ES ⁽⁸¹⁾. A ativação das células T com consequente produção de IL-4 e ativação das células B, poderia contribuir para as manifestações clínicas da ES através de duas vias principais: o aumento na produção de IL-6 pelos linfócitos B, que poderia estimular a produção de MEC e a produção de IL-4 resultante de uma resposta imune predominante Th2, que induziria a expressão de TGF- β em células B, sendo um potente fator de crescimento pró-fibrótico ⁽⁸²⁾. Portanto a função alterada das células B na ES poderia explicar não somente a produção de autoanticorpos, mas também a fibrose, uma vez que os linfócitos B ativados produzem IL-6, que diretamente estimula fibroblastos ⁽¹⁾.

Considerados os dados expostos acima e em conjunto com análises de genomas e proteomas, sugere-se uma participação igualmente importante de fibroblastos, linfócitos B, linfócitos T, células endoteliais e o sistema de coagulação na patogênese da ES ⁽⁷³⁾.

1.3.3 Fibrose tecidual

Uma hipótese para a patogênese das desordens fibróticas implica em um balanço alterado entre citocinas Th1 e Th2. As células T polarizadas para um fenótipo de células Th2 secretam abundante IL4, IL-5 e IL13. Em modelos experimentais, a transferência passiva *in vivo* de células polarizadas Th2 pode induzir fibrose ⁽¹⁾. Na ES são detectados elevados níveis de fatores de crescimento (incluindo TGF- β , CTGF, VEGF e FGF), interleucinas (incluindo IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13), quimiocinas e citocinas (incluindo MCP-1 e TNF- α) ^(36,83, 84). Ademais, uma série de moléculas de sinalização intracelular estão envolvidas com o processo de fibrose na ES, tais como BMPs, Smads, FAK ⁽⁸⁵⁾, JAK-2 ⁽⁸⁶⁾, CB2 ⁽⁸⁷⁾ e fatores de transcrição Fli-1, Ets-1, p53 e RAS ⁽⁸⁴⁾.

Embora o TGF- β e o CTGF sejam considerados como fundamentais na patogênese da ES, outras moléculas podem ser cruciais para o desenvolvimento de fibrose na ES ^(88, 89). A IL-15 foi associada à fibrose, bem como à doença vascular pulmonar e vasculopatia digital observada pela capilaroscopia na ES precoce. Podemos explicar estes efeitos da IL-15 através de sua capacidade de indução de sobrevivência de linfócitos T e B, além de prevenir a apoptose de miofibroblastos produtores de colágeno ⁽⁹⁰⁾. Okamoto e cols demonstraram que a IL-17A contribuiu para a fibrose cutânea em dois modelos murinos de ES, uma vez que a perda de IL-17A atenuou a fibrose cutânea induzida por bleomicina e também o endurecimento cutâneo de camundongos TSK-1 ⁽⁹¹⁾.

O papel do TNF na ES parece ser pró-fibrótico, uma vez que os linfócitos T expressam grandes quantidades de receptor tipo 2 de TNF e sua coestimulação via receptores desencadeia ainda mais a produção de colágeno ⁽⁹²⁾. Outra molécula regulatória hiperexpressa em linfócitos B de pacientes com ES é o CD19, tendo importante papel na fibrose cutânea possivelmente através do aumento na produção de IL-6 e autoanticorpos ⁽⁹³⁾. Em camundongos, a bleomicina induz fibrose através da produção aumentada de hialuronano, o qual ativa as células B a produzir citocinas fibrogênicas principalmente via *toll-like receptor 4* e induz produção de autoanticorpos, no entanto, a deficiência de linfócitos CD19 suprime a

fibrose e produção de anticorpos pela inibição dos sinais *toll-like receptor 4* ⁽⁹⁴⁾.

Descobriu-se ainda a participação de reguladores pós-transcripcionais de genes pró-fibróticos na ES, através da observação de que o microRNA-29 (miR-29) reduz diretamente a produção de colágeno, no entanto a secreção de TGF- β , PDGF ou IL-4 reduziu a expressão de miR-29 ⁽⁹⁵⁾.

Mais recentemente, descreve-se a elevação sérica dos níveis de IL-27 em pacientes com ES, que está relacionada com a ativação de fibroblastos, linfócitos T e B, incluindo correlação positiva com a extensão da fibrose cutânea e pulmonar além de anormalidades imunológicas como a indução da produção de IL-17 ⁽⁹⁶⁾.

No último ano, foram propostas três novas abordagens para complementar o entendimento da fisiopatogenia da fibrose na ES. A serotonina (5-HT), uma substância vasoativa que pode mediar a fase inicial de vasoconstrição do fenômeno de Raynaud, foi implicada na ES, uma vez que 5-HT armazenada em plaquetas induz a síntese de MEC e camundongos deficientes para o receptor da 5-HT foram protegidos da fibrose induzida experimentalmente ⁽⁹⁷⁾. O segundo estudo descreve que a sinalização a partir de vias morfogênicas, tais como Wnt, Hedgehog e Notch, tem emergido como peças chave na patogênese de doenças fibróticas como a ES, por estimularem fibroblastos de forma vigorosa a se diferenciarem em miofibroblastos e liberar colágeno e outros componentes da MEC, induzindo fibrose ⁽⁹⁸⁾.

Por fim, Aida-Yasuoka e cols implicam o estrogênio no desenvolvimento de doenças autoimunes, baseado em sua habilidade de promover a sobrevivência e ativação de linfócitos B, facilitando a auto reatividade. O estradiol foi identificado como um indutor de expressão de fibronectina em fibroblastos cutâneos de pacientes com ES e os efeitos pró-fibróticos do estradiol, bem como o aumento nos níveis circulantes de estradiol e estrona explicam, pelo menos em parte, a maior frequência de ES em mulheres. Em modelo murino de fibrose pulmonar induzido por bleomicina, o papel pró-fibrótico do estradiol foi confirmado, visto que as animais fêmeas apresentavam uma resposta fibrótica mais pronunciada do que os machos, que foi atenuada após ooforectomia e acentuada com a terapia de reposição hormonal ⁽⁹⁹⁾.

Os mecanismos de fibrose cutânea na ES são atribuídos ao desbalanço das citocinas que regulam o metabolismo da MEC, desregulação das moléculas envolvidas na degradação do colágeno e anormalidades no processo de fibrilogênese, principalmente a nível

de transcrição⁽¹⁰⁰⁾. Mais ainda, cultura de fibroblastos derivados da pele de pacientes com ES, que estão isentos de fatores ambientais, continuam a produzir excessivas quantidades de proteínas da MEC, sugerindo que uma vez ativadas, estas células estabelecem um sistema de auto ativação constitutivo^(100, 101). O TGF- β é a principal molécula autócrina sinalizada pelos fibroblastos na ES e capaz de induzir a produção de CTGF. Esta, por sua vez, pode modular a via Smad de forma independente da interação com TGF- β , desta forma aumentando os receptores de ligação e prolongando a sinalização de TGF- β ^(100, 102). In vivo, a injeção subcutânea apenas de TGF- β 1 ocasiona indução transitória de fibrose cutânea, enquanto a adição de CTGF após TGF- β 1 causa persistente fibrose dérmica^(100, 102).

No pulmão de pacientes com ES, o processo de fibrose se inicia com uma doença intersticial, caracterizada pela ativação de fibroblastos, associada a produção excessiva de proteínas da MEC e mediadores biológicos que são responsáveis por causar inflamação e posterior fibrose^(103, 104). Contudo, os fibroblastos não são a única fonte de fibrose na ES, os miofibroblastos são ativados por sinais parácrinos e autócrinos, além dos TLRs em fibroblastos e constituem a maior fonte de TGF- β ⁽⁸⁴⁾. A fibrose também é conduzida por múltiplos mediadores, como PDGF, VEGF, ET-1, IL-13, IL-21, MCP-1, caspases entre outros^(84, 105). Conjuntamente, um balanço anormal entre metaloproteinases e seus inibidores resulta em síntese excessiva de MEC e acarreta acúmulo de colágeno e fibrose⁽⁸³⁾.

O processo de remodelamento pulmonar envolve uma complexa interação entre constituintes do parênquima e intersticiais, dentre os quais se destacam o epitélio, a microvasculatura e MEC. Em pacientes com ES com pneumonia intersticial usual (PIU) ou idiopática, existem evidências que sugerem que os componentes da MEC não somente participam do processo de remodelamento e deste modo permitem mudanças na vascularização, mas também regulam a proliferação endotelial. No pulmão, fibroblastos intraluminais apresentam um fenótipo contrátil e representam importante fonte de produção de colágeno, sendo demonstrado pelos pesquisadores do LIM-17 do HCFMUSP um aumento do colágeno tipo V na PIU⁽¹⁰⁶⁾.

1.4 Auto anticorpos em esclerose sistêmica

Anticorpos altamente específicos podem ser detectados no soro de virtualmente todos os pacientes com ES^(1, 75). Os mecanismos postulados para o desenvolvimento de

autoanticorpos em pacientes com ES incluem mimetismo molecular, hiperreatividade crônica de linfócitos B decorrente de ativação via citocinas produzidas pela ativação do sistema Th2 e expressão aumentada ou localização subcelular alterada de peptídeos potencialmente autoantigênicos ⁽¹⁾. Alguns anticorpos não parecem ser simplesmente epifenômenos, mas sim estarem envolvidos na patogênese da doença ⁽⁷⁰⁾. Autoanticorpos poderiam estar envolvidos da patogênese da ES tanto por amplificarem a resposta imune quanto por ativar os tipos celulares que são relevantes na fisiopatologia da doença ⁽⁸²⁾.

A importância do estudo de autoanticorpos na ES reside no fato de que alguns deles apresentam associação restrita com a doença e participam dos critérios propostos por LeRoy e Medsger para o diagnóstico precoce da patologia, o que lhes confere considerável valor diagnóstico ^(8, 107, 108). Além disso, estão associados a determinados traços fenotípicos da doença e são utilizados para auxiliar na classificação e caracterização das duas formas clínicas principais: forma difusa e forma limitada ^(108, 109). Foi observada ainda uma estreita relação entre níveis de anticorpos anti-topoisomerase I e a gravidade do envolvimento cutâneo e atividade global da doença na ES, revelando um possível papel prognóstico ^(108, 110). Relatam-se ainda significantes correlações entre o padrão de anticorpo apresentado com a resposta terapêutica ⁽¹¹¹⁾.

Os autoanticorpos específicos encontrados na ES apresentam características fundamentais de uma resposta desencadeada por antígeno, sendo representados principalmente por: anticorpos anticentrômero (ACA), anticorpos anti DNA topoisomerase I (anti Scl70) e anticorpos anti RNA polimerase III (anti POL 3) ^(67, 107, 108, 112).

ACA foram observados em cerca de 20 a 30% dos pacientes com ES ^(108, 112) e em 55 a 80% dos pacientes com a forma limitada ⁽¹⁰⁷⁾, embora possa variar entre populações étnicas diferentes ^(108, 112). Os ACA reconhecem três proteínas diferentes no centrômero: CENP-A, CENP-B e CENP-C ^(67, 107, 113), entretanto foi identificado em 2004 um novo constituinte centromérico denominado CENP-O, ao qual foi alvo de anticorpos em pacientes com ES ⁽¹¹³⁾. Os ACA tem valor preditivo para futuro desenvolvimento de ES em pacientes avaliados com fenômeno de Raynaud e estão associados com envolvimento cutâneo limitado, dano vascular periférico e calcinose ^(108, 112). A presença de ACA geralmente traz um melhor prognóstico do que observado com outros autoanticorpos, uma vez que estão associados com menor frequência de fibrose intersticial pulmonar ^(108, 112), além de que os títulos de anti CENP-B demonstraram uma relevância clínica ao exibir correlação inversa com a extensão de envolvimento cutâneo ⁽¹¹⁴⁾.

Anticorpos anti DNA topoisomerase I (anti Scl70) são descritos em 40% dos pacientes com ES ⁽¹¹²⁾, em cerca de 28 a 70% dos pacientes com a forma difusa da ES ^(107, 108, 112) e em menos de 10% dos pacientes com a forma limitada ^(67, 107, 108). Neste caso, também se observa que diferenças étnicas consideravelmente afetam a prevalência do anti Scl70, sendo observado em menor proporção em brancos caucasianos. O anti Scl70, quando determinado por imunodifusão, virtualmente nunca é visto em indivíduos saudáveis, em outras doenças do conjuntivo ou em pacientes com FRy primário ^(108, 112). Contudo, sua presença está relacionada com pior prognóstico, atividade global da doença, gravidade do envolvimento cutâneo, doença intersticial pulmonar e acometimento cardíaco ^(107, 108, 112, 115, 116, 117).

Anticorpos anti RNA polimerase III (anti POL 3) foram observados em diferentes frequências provavelmente relacionadas a alterações genéticas e raciais. Em diversas coortes com ES variou de 4 a 9,4% em pacientes franceses, 12% em ingleses, 6% em japoneses, 19,4% em canadenses e 25% em americanos ^(107, 118). Autoanticorpos contra RNA polimerase I e III habitualmente coexistem em uma prevalência de 20% e este padrão é altamente específico de ES ^(107, 108, 112). O anti POL 3 também apresenta papel prognóstico, uma vez que foi relacionado ao acometimento difuso da pele, crepitação tendínea e acometimento renal ^(107, 118, 119). Ademais, importantes associações incluem hipertensão sistêmica, sinovite, miosite e possível relação com malignidades, predominantemente câncer de órgãos sólidos ^(118, 119).

No Brasil, recentemente um grupo de pesquisadores da região sul descreveu em 85 pacientes com ES a ocorrência dos principais autoanticorpos específicos: anti POL 3, anti Scl70 e ACA, respectivamente em 41,18%, 31,76% e 30,59% dos pacientes. Os autores ratificam o papel relevante dos autoanticorpos na avaliação dos pacientes com ES, sendo possível correlacionar o perfil autoimune dessa população nacional com manifestações específicas da doença ⁽¹²⁰⁾.

Outros anticorpos observados na ES e em outras enfermidades associadas ao espectro da esclerose sistêmica são: anticorpos antifibrilarina (U3 RNP), anticorpos anti RNA polimerase I, anticorpos anti Th/To, anticorpos anti Pm/Scl, anticorpos anti região organizadora de nucléolo (anti NOR 90), anticorpos anti Ku ^(107, 108, 112) e anticorpos anti U11/U12 RNP ⁽¹¹²⁾.

Anticorpos antifibrilarina (U3 RNP) foram encontrados na ES em 4% dos pacientes caucasianos e 16 a 23% dos afrodescendentes ^(107, 108, 112), sendo descritos em pacientes com LES, Sjögren, doença mista do tecido conjuntivo (DMTC) e FRy primário ^(67, 108, 112). Considerados altamente específicos para a forma difusa da doença, principalmente

quando encontrados em afroamericanos⁽¹⁰⁸⁾. Anticorpos antifibrilarina são mutuamente excludentes com ACA, anti Scl70 e anti POL 3^(67, 108, 112). Anti U3 RNP foram associados com miosite, hipertensão pulmonar (HAP) e doença renal, embora não tenha sido relacionado com uma maior taxa de mortalidade⁽¹⁰⁸⁾.

Os anticorpos anti RNA polimerase I estão presentes em 4 a 11% dos pacientes com ES^(107, 108), associados às formas difusas e graves⁽¹⁰⁷⁾. Também já foram relacionados com maior envolvimento cardiovascular e renal, conferindo associação importante com baixa sobrevida^(67, 107).

Anticorpos anti Th/To são descritos em 2 a 10% dos pacientes com ES^(67, 107, 108, 112), sendo provavelmente mais frequentes em japoneses⁽¹⁰⁸⁾, quase nunca são vistos em indivíduos saudáveis, porém já foram observados em pacientes com LES, polimiosite e FRy primário⁽¹⁰⁸⁾. São indicativos de forma limitada de ES e relacionados com envolvimento orgânico importante, crise renal esclerodérmica sem doença intersticial pulmonar e HAP, conferindo pior prognóstico^(67, 107, 108, 112).

Anticorpos anti Pm/Scl estão associados à sobreposição entre ES forma limitada e polimiosite, sendo encontrados em 4 a 11% dos pacientes com ES⁽¹¹²⁾, sendo menor a prevalência no Japão⁽¹⁰⁷⁾. Até 80% dos pacientes portadores de anti Pm/Scl vão desenvolver síndromes de sobreposição⁽¹⁰⁸⁾. Estes anticorpos estão relacionados com miosite, artrite, FRy e envolvimento cutâneo limitado, conferindo bom prognóstico^(67, 107).

Anticorpos anti região organizadora de nucléolo (anti NOR 90) não são específicos de ES, sendo descritos em AR, LES, Sjögren, FRy, doença indeterminada do tecido conjuntivo (DITC) e malignidades^(107, 112). Relata-se que cerca de 50% dos pacientes com anti NOR 90 apresentam FRy⁽¹⁰⁷⁾.

Anticorpos anti Ku foram originalmente relacionados especificamente com ES, todavia foram descritos posteriormente em pacientes com LES, miosite e síndromes de sobreposição^(108, 112).

Por fim, anticorpos anti U11/U12 RNP foram relatados em 33 pacientes com ES. Todos os pacientes com este anticorpo apresentavam FRy, 82% tinham envolvimento gastrintestinal e 79% fibrose pulmonar, embora nenhum paciente tivesse HAP⁽¹¹²⁾.

Outros autoanticorpos geralmente relacionados a outras doenças do tecido conjuntivo igualmente são observados na ES, embora em baixa frequência, tais como: Fator reumatóide em 30 a 40% dos pacientes⁽¹⁰⁷⁾; anticorpo anti citoplasma de neutrófilos (ANCA)

em 3% dos pacientes ⁽¹⁰⁸⁾; anti Sm em 2% dos pacientes, mais frequentes na sobreposição com LES e conferindo mau prognóstico ^(107, 108); anti U1 RNP em até 35% dos pacientes, mas geralmente associado à DMTC ^(107, 108, 112); anti Ro (SSA) em até 10% dos pacientes com ES, embora 35% dos pacientes com ES positivos para anti Ro (SSA) apresentem associação à síndrome de Sjögren ^(107, 108); anti β 2 glicoproteína I em até 10% dos pacientes e anticorpos anticardiolipina em média observados em 20 a 25% dos pacientes (variando amplamente entre 0 a 63%), embora a síndrome antifosfolípide seja raramente associada à ES (menos de 1%) ^(107, 108, 112); anticorpos anti mitocôndria encontrados em 7% dos pacientes com ES ⁽¹⁰⁷⁾; anticorpos marcadores de miosite e sobreposição tais como anti histidil tRNA sintetase (anti Jo 1) e anti treonil tRNA sintetase (anti PL 7) são descritos em pequeno grupo de pacientes com ES ⁽¹⁰⁷⁾; anticorpos anti histonas observado em um estudo com pacientes com a forma limitada ⁽¹⁰⁸⁾.

Diferentemente de LES, observa-se em pacientes com ES que a produção de um autoanticorpo específico é exclusiva, portanto a ocorrência de mais de um tipo de anticorpo em um paciente é rara, exceção feita aos anticorpos contra as RNA polimerases ^(107, 108, 112). A coexistência entre anti Scl70 e ACA na ES é pouco frequente (0,5 a 5,5%), embora anteriormente alguns autores os consideravam mutuamente exclusivos ⁽¹²¹⁾. Embora a correlação entre anticorpos que definem os subtipos da ES seja incomum, já foram descritos a coexistência de ACA ou anti Scl70 com anticorpos anti histona, ACA com anticorpos anti mitocondrial, anti Scl70 com anticorpos anticardiolipina, ACA ou anti Scl70 com anticorpos anti Ro (SSA) ou anti RNPs com anticorpos anti Th/To ⁽¹²²⁾.

Alguns autoanticorpos podem ser inespecíficos, como a descrição da ocorrência de anticorpos antipeptídeo citrulinado cíclico (anti CCP) em seis pacientes com ES ⁽¹²³⁾ e anticorpos antinucleossoma em dois pacientes com ES ⁽¹²⁴⁾, embora este último tenha sido detectado com alta prevalência (82%) em pacientes com esclerodermia localizada ⁽¹²⁵⁾. Na ES, ainda são descritos anticorpos anti receptor de proteína 2 relacionado com lipoproteína de baixa densidade (LRP2), bem como na AR e tireoidite autoimune ⁽¹²⁶⁾.

Entretanto, a maioria dos pacientes com ES exibem níveis circulantes de autoanticorpos altamente específicos: um grupo de autoanticorpos é dirigido contra antígenos nucleares (topoisomerase, RNA polimerase) enquanto outros podem desempenhar um papel patogênico ⁽³⁶⁾. Com relação a especificidade dos autoanticorpos, sabe-se que o anti DNA topoisomerase I é o principal anticorpo da forma difusa da doença ^(115, 116, 117), enquanto o anti DNA topoisomerase II não foi detectado em pacientes com ES ⁽¹²⁷⁾.

Estudos ressaltam o potencial patogênico de autoanticorpos em pacientes com ES, sugerindo que anticorpos específicos contra fibroblastos, células endoteliais e receptores para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) podem diretamente causar ativação de fibroblastos e células endoteliais e contribuir para o dano tecidual ^(1, 68, 73, 128).

Estima-se uma ocorrência de 44 a 84% de anticorpos anti células endoteliais (ACEs) em pacientes com ES, tal anticorpo pode induzir a apoptose ^(36, 75) e existe também uma tendência significativa entre positividade do anticorpo ACEs com o aumento da gravidade da doença ⁽¹²⁸⁾. Anticorpos anti fibrilina 1 (AAF1) são detectados em mais de 50% dos pacientes com ES e podem ativar fibroblastos, resultando na produção aumentada de componentes da MEC e estimular a secreção de TGF- β ^(36, 75, 108). Anticorpos estimulatórios anti receptor PDGF são detectados em pacientes com ES e são potencialmente patogênicos, pois induzem a produção de colágeno tipo 1 através da cascata de espécies reativas de oxigênio e convertem fibroblastos em repouso a miofibroblastos ativados ^(36, 75, 82). Anticorpos anti metaloproteinase (MMP) 1 e 3 também são observados em grande proporção de pacientes e agem prevenindo a degradação de colágeno excessivo ^(36, 82).

Mais recentemente foi descrita a ocorrência de anticorpos anti anexina V em 75% dos pacientes com ES, os quais demonstraram ser um preditor sensível de dano vascular nestes pacientes e poderiam servir como um útil parâmetro discriminador de quais pacientes teriam alto risco de dano vascular ⁽¹²⁹⁾.

Outro grupo de pesquisadores observou a presença de autoanticorpos contra a proteína do choque térmico 47 (HSP47) no soro de pacientes com ES e em um modelo animal para ES. Como a HSP47 está expressa na superfície de fibroblastos de pacientes com ES, então o anticorpo anti-HSP47 poderia bloquear as funções da HSP47, que resultaria em deposição de colágeno. A expressão aumentada da HSP47 tem sido demonstrada em modelos experimentais, com desenvolvimento de fibrose de pulmão, rim e fígado ⁽¹³⁰⁾. Posteriormente foram identificados anticorpos anti fibroblastos (AFA) em pacientes com HAP primária e em um grupo de pacientes com ES associada a HAP ⁽⁸²⁾. Os AFA foram capazes de se ligar à superfície celular dos fibroblastos e induzir um fenótipo pró-adesivo e pró-inflamatório, aumentando a expressão de ICAM-1 e IL-6 em mais de 40% dos pacientes com ES ⁽¹³¹⁾. O mesmo grupo posteriormente destacou que os AFA aumentaram a atividade fibroblástica de quebra do colágeno por favorecer a transcrição dos genes MMP-1 e MMP-9, bem como a produção aumentada de MMP-1 ⁽¹³¹⁾.

Demonstrou-se ainda a ocorrência de anticorpos IgG reativos contra moléculas

nativas e desnaturadas de colágeno em um terço de pacientes com ES. Postula-se que tais anticorpos anticolágeno poderiam representar o subproduto de uma resposta imune celular na ES, através da liberação de interleucinas, na deposição anormal que caracteriza a patologia (132).

1.5 Modelos experimentais de esclerose sistêmica

Os modelos experimentais são ferramentas muito importantes para o entendimento da fisiopatologia da ES. Estes modelos reproduzem diversos aspectos histológicos e imunológicos da ES observados em humanos e possibilitam analisar os eventos mais precoces envolvidos no desencadeamento e perpetuação da ES, tais como o dano vascular inicial e a resposta imune subsequente (133, 134).

Os modelos animais de ES podem ocorrer naturalmente, como os camundongos com deficiência de relaxina e o TSK-1, além da galinha UCD-200; podem ser induzidos por administração de substâncias como a bleomicina e o cloreto de vinila, bem como induzida nos camundongos TSK-2 ; podem se desenvolver após transplantes como os camundongos GvHD I e o GvHD II; ou ainda através de modificação genética como o camundongo transgênico deficiente em receptor quinase tipo II do TGF- β ou condicional expressão do receptor tipo I do TGF- β e camundongo MRL deficiente em receptores do IFN- γ (133, 134).

Recentemente, Yamamoto demonstrou que camundongos com deficiência de relaxina se apresentam com fibrose cutânea caracterizada por endurecimento da pele e aumento no conteúdo de colágeno. Fibroblastos derivados da pele destes camundongos deficientes produzem altos níveis de colágeno (133).

Os animais TSK-1, conhecidos como camundongos de pele espessa, apresentam mutação em heterozigose para o gene 1 da fibrilina. A fibrilina é uma proteína estrutural da MEC e o maior componente das microfibrilas. A característica mais marcante neste modelo é a presença de uma pele fibróticas espessa que é aderida firmemente ao subcutâneo e tecido muscular profundo, além da positividade para anti-topoisomerase I (133, 134, 135). Curiosamente, os camundongos pN/pN, que são deficientes para o gene da cadeia alfa 2 do COLV e apresentam fragilidade cutânea associada a alteração na organização das fibras do colágeno, quando reproduziram com o camundongo TSK-1, ocorreu a geração de descendentes que não

apresentam nem hiperplasia cutânea e nem produzem anticorpos anti-topoisomerase I ⁽¹³⁶⁾.

As UCD-200 são uma linhagem pura de galinhas que desenvolvem espontaneamente dano vascular, infiltrado de células mononucleares, fibrose da pele e órgãos internos e poliartrite. Ademais, observa-se a presença de anticorpos anti células endoteliais, que induzem a apoptose destas células por meio de citotoxicidade mediada por anticorpos via Fas ^(133, 134).

O camundongo TSK-2 é resultado da administração de um agente mutagênico chamado etil-nitroso-uréia (ENU) que induz uma mutação no cromossomo 1 e apenas os animais heterozigotos sobrevivem ⁽¹³³⁾. O animal desenvolve um fenótipo semelhante ao TSK-1 de endurecimento da pele, com acúmulo de colágeno ^(133, 134). Alta frequência de anticorpos anti-topoisomerase I e anticentrômero foram observados nestes camundongos, embora tenha sido observado ainda múltiplas especificidades de anticorpos, como por exemplo anticorpo anti DNAds e anticorpo anti CENP-B ⁽¹³⁷⁾.

Injeções repetidas do antibiótico antitumoral bleomicina por via intradérmica ou subcutânea na pele raspada do dorso de camundongos induzem a esclerose cutânea. Interessantemente, as mudanças escleróticas não foram induzidas em regiões remotas do animal, mas a transferência de células T CD4⁺ dos camundongos tratados induziu as mesmas alterações patológicas em camundongos BALB/c não tratados ^(133, 134).

A ativação de microquimerismo induzida pelo solvente cloreto de vinila está associada com o aparecimento de inflamação cutânea e fibrose, similar ao que ocorre na doença enxerto versus hospedeiro ⁽¹³⁴⁾.

No modelo de doença enxerto-versus-hospedeiro I (GvHD I), o transplante de células esplênicas de camundongos B10.D2 em camundongos BALB/c irradiados ocasionou fibrose pulmonar e cutânea, além de infiltrados de células T CD3⁺, monócitos e macrófagos ^(133, 134). Por outro lado, na GvHD II, a transferência de células esplênicas de camundongos B10.D2 em camundongos com deficiência de RAG-2, resultou em fibrose sistêmica, inflamação e surgimento de autoanticorpos ⁽¹³⁴⁾.

A geração de camundongos transgênicos que expressam deficiência em receptor quinase tipo II do TGF- β acarretou o desenvolvimento de fibrose pulmonar e cutânea. Por outro lado, a expressão condicional do receptor tipo I do TGF- β induziu em camundongos uma fibrose generalizada e inflamação ⁽¹³⁴⁾.

Por fim, a linhagem de camundongos MRL-lpr com deficiência de receptores de

IFN- γ também desenvolveu inflamação e fibrose sistêmica ⁽¹³⁴⁾.

1.6 Modelo de esclerose sistêmica induzido por meio da imunização com colágeno tipo V

O modelo experimental inédito de esclerodermia em coelhos foi descrito pela primeira vez por um grupo nacional liderado por Yoshinari e cols em 2002, após imunização com colágeno tipo V ⁽¹³⁸⁾. Neste modelo, a introdução de um fator exógeno imunogênico promoveu o aparecimento de lesões patológicas em múltiplos órgãos de um animal sadio da raça Nova Zelândia, muito semelhantes às observadas em pacientes com ES ^(138, 139, 140).

Do mesmo modo, comprovou-se a relevância deste modelo experimental através da demonstração de disfunção do sistema humoral, caracterizada pela presença de anticorpos antinucleares (ANA) com especificidade citoplasmática contra o complexo de Golgi, mas principalmente pela positividade para anticorpos anti-topoisomerase I, que é específico para ES ^(139, 140).

Ademais, alterações patológicas em diversos órgãos deste modelo animal guardam correlação com aquelas encontradas em pacientes com ES. Por exemplo, no trato gastrointestinal observou-se na imunohistoquímica um acúmulo de fibras colágenas na submucosa e camada muscular esofágica, com característico remodelamento da MEC, com aumento de alguns tipos de colágeno e redução de outros ^(140, 141).

Sabe-se que o endurecimento cutâneo é a marca registrada da ES e ocorre em quase todos os pacientes ^(7, 8, 9). Em relação às manifestações cutâneas deste modelo em coelhos, observou-se que o aumento no colágeno ocorreu a partir do sétimo dia após a primeira imunização com COLV e que mesmo após o término da série de imunizações, o remodelamento cutâneo ocasionado pelo depósito de colágeno foi progressivo ^(39, 140).

Observou-se ainda nos pulmões a presença de vasculopatia, especialmente nos lobos basais, caracterizados pelo espessamento da íntima vascular, infiltrado celular e depósito de colágeno na região subendotelial, perivascular, peribrônquica e interstício pulmonar ^(138, 140). Estudos neste mesmo modelo em coelhos demonstraram que a remodelação do eixo broncovascular na bronquiolite obliterante pode ser revertida através da indução de tolerância nasal ao colágeno V, sugerindo-se como possível mecanismo a supressão dos

linfócitos T^(140, 142). Também demonstrou-se que a excessiva produção de TGF- β no modelo animal, que é uma das principais citocinas pró fibróticas, foi revertida à normalidade após a indução de tolerância nasal com o colágeno V^(140, 143).

Finalmente, diversas outras alterações encontradas no modelo induzido por meio da imunização do COLV foram idênticas às observadas em pacientes com ES, tais como o depósito de colágeno entre as fibras cardíacas no coração. Nos rins, observou-se alterações nos glomérulos renais com discreta proliferação mesangial, espessamento da membrana basal e moderado depósito de colágeno intersticial. Na sinóvia, ocorreu proliferação das células epiteliais e depósito de colágeno subepitelial, bem como a demonstração do aumento da celularidade e remodelamento da matriz extracelular em estudo histológico da cartilagem articular^(138, 140).

Importantemente, ao compararmos estes 12 modelos experimentais de estudo da ES citados anteriormente, observamos múltiplas diferenças entre eles, sendo alguns mais completos no sentido de reproduzirem a maioria das manifestações clínicas e laboratoriais encontradas em pacientes com ES. O modelo experimental induzido por meio da imunização do COLV é o único que preenche todos os seguintes parâmetros observados nos pacientes: fibrose cutânea, esclerose cutânea, fibrose pulmonar, fibrose renal, lesão vascular, aumento na deposição de colágeno, aumento de TGF- β e presença de autoanticorpos, inclusive específicos de ES.

1.7 Colágeno V

A matriz extracelular (MEC) compõe o tecido conjuntivo e representa o ambiente de todas as células fora da circulação, sendo reconhecida como uma grande estrutura reguladora ou instrutiva no comportamento celular, através da sinalização via receptores e moléculas de adesão da matriz, bem como através da ativação de fatores de crescimento⁽¹⁴⁴⁾.

A MEC pode ser subdividida em dois tipos principais: o fibrilar e o fundamental. As variadas fibras de colágenos, reticulina e elastina formam a MEC fibrilar. Enquanto os proteoglicanos, glicoproteínas e glucosaminoglicanos representam a MEC fundamental⁽¹⁴⁵⁾.

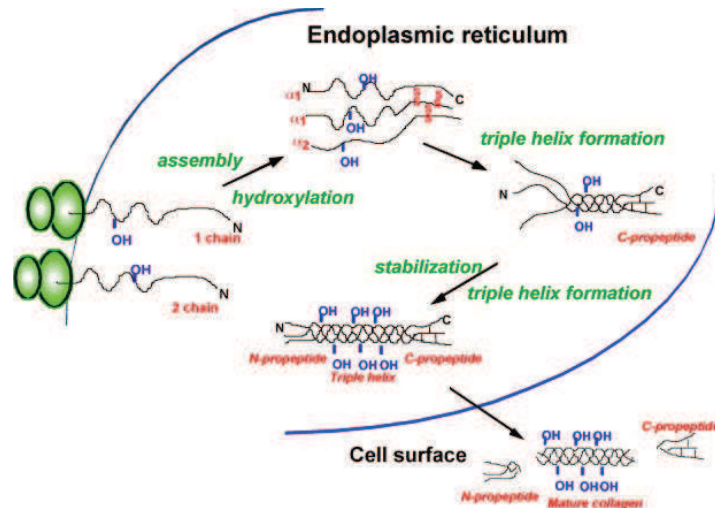
Entre as diversas substâncias que formam a MEC, apenas as fibras de colágenos e os proteoglicanos são onipresentes, encontrados em todos os tecidos conjuntivos⁽¹⁴⁵⁾.

Atualmente são descritos mais de 30 colágenos e proteínas relacionadas aos colágenos, sendo os mais abundantes os tipos I e III ⁽¹⁴⁶⁾. Os tipos de colágenos podem ser divididos em famílias com base na formação de certas estruturas poliméricas ou outras características ⁽¹⁴⁷⁾. O colágeno tipo V (COLV) faz parte da família dos colágenos fibrilares, junto com os tipos I a III e XI ⁽¹⁴⁷⁾.

Os colágenos fibrilares formam a base estrutural de órgãos e tecidos, incluindo vasos, ossos e tendões. Também formam esqueletos dinâmicos com sítios de reconhecimento e ligação para ligantes, células e plaquetas ⁽¹⁴⁸⁾.

Todas as moléculas de colágenos consistem de 3 cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias alfa (α), que estão entrelaçadas entre si em uma estrutura de tripla hélice. Em alguns tipos de colágenos, as três cadeias α são idênticas, enquanto que em outros tipos existem duas ou mesmo três diferentes cadeias α ⁽¹⁴⁷⁾. O COLV em geral é caracterizado por uma molécula de tripla hélice composta de duas cadeias alfa 1 ($\alpha 1$) e uma cadeia alfa 2 ($\alpha 2$) ⁽¹⁴⁷⁾. No entanto, em alguns tecidos como o osso recém sintetizado e o cordão umbilical, encontramos na composição da tripla hélice do COLV, uma pequena parcela de cadeia alfa 3 ($\alpha 3$) ^(149, 150). Interessantemente, encontrou-se pró cadeia alfa 3 de COL V na matriz extracelular de um modelo murino de cicatrização de feridas, sugerindo-se sua importância no início do processo de recuperação tecidual, bem como no desenvolvimento normal dos tecidos ⁽¹⁵⁰⁾.

A biossíntese dos colágenos fibrilares se inicia a partir da síntese das cadeias pró-alfa no retículo endoplasmático, seguindo-se da hidroxilação de alguns resíduos de prolina e lisina nestas cadeias. Posteriormente as hidroxilisinas sofrem glicosilação e as três cadeias pró-alfa entrelaçam-se formando a tripla hélice da molécula de pró-colágeno, que são empacotadas no complexo de Golgi e secretadas. Imediatamente no espaço extracelular, os pró-peptídeos amino e carboxi-terminal dos colágenos I e III são clivados, mas isso não ocorre com o colágeno V. As moléculas recém formadas de colágeno agregam-se formando fibrilas. Por sua vez, a união de diversas fibrilas dá origem as fibras colágenas ^(145, 151). Essas etapas da biossíntese dos colágenos podem ser observadas resumidamente na Figura 1 ⁽¹⁵¹⁾ a seguir:



Fonte: Yamauchi M et Sricholpech, 2012

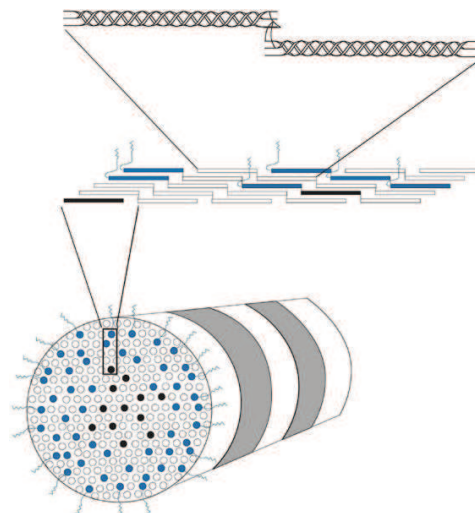
As fibras de colágeno nos diferentes tecidos são frequentemente heterotípicas, contendo mais que um tipo de colágeno. O COLV frequentemente encontra-se associado com os colágenos I e III, formando fibrilas heterotípicas encontradas principalmente no interstício pulmonar e pele. Embora o COLV seja o menos frequente componente encontrado na formação destas fibrilas heterotípicas, uma mutação em suas cadeias alfa 1 ou 2 leva ao desenvolvimento da síndrome de Ehlers-Danlos, caracterizada por hiperextensibilidade da pele, hipermobilidade articular e fragilidade cutânea ^(150, 152, 153, 154, 155). Através desta associação, o COLV desempenha papel fundamental no controle da fibrilogênese, de modo que ao se aumentar a proporção do COLV, progressivamente ocorre redução do diâmetro das fibras heterotípicas produzidas ⁽¹⁵⁶⁾, como observado na córnea ⁽¹⁵⁷⁾. O COLV atua como um importante regulador do tamanho e da forma das fibrilas de colágeno ⁽¹⁵⁰⁾.

O COLV foi isolado pela primeira vez do tecido placentário humano por Burgeson e colaboradores em 1976 ⁽¹⁴⁹⁾. Em camundongos, a decidualização compreende um profundo remodelamento dos componentes da MEC do endométrio, sendo encontrado o COLV em grande quantidade nas áreas decidualizadas durante o sétimo dia de gravidez ⁽¹⁵⁸⁾. Observou-se uma diminuição da expressão de COLV em tecidos de decídua humanos durante aborto espontâneo precoce ⁽¹⁵⁹⁾ e aumento do nível relativo de COLV durante o desenvolvimento e envelhecimento da placenta ⁽¹⁶⁰⁾.

O COLV representa a menor quantidade de colágeno fibrilar na maioria dos tecidos conjuntivos (2 a 5%) e é encontrado principalmente na córnea, onde representa 15 a 20% dos colágenos fibrilares neste tecido ^(161, 162). Também já foi identificado em muitos

outros tecidos, como vaso sanguíneo, osso, cartilagem, músculo esquelético, pele, sinóvia, rim, pulmão e tendão ⁽¹⁴⁹⁾.

Interessantemente, o COLV apresenta características distintas dos outros colágenos fibrilares, como uma susceptibilidade diferente à clivagem pelas metaloproteinases (MMP) e uma forte afinidade com outras macromoléculas tais como heparina, trombospondina ⁽¹⁵⁵⁾ e insulina ⁽¹⁶³⁾. Uma possível explicação para esta característica funcional diferente do resto dos colágenos fibrilares refere-se ao fato do COLV conservar os telopeptídeos NH₂ e COOH terminais, durante sua biossíntese, os quais também tornam a molécula mais imunogênica que as demais ⁽¹⁶⁴⁾. A interação entre algumas fibrilas de colágenos pode ser observada na Figura 2 abaixo ⁽¹⁶⁵⁾:



Fonte: Dawson, DG, Watsky MA, Geroski DH, Edelhauer HF. 2006

A imagem anterior representa uma visão transversal oblíqua de fibrilas heterotípicas de colágeno corneano estromal (inferior) composta de moléculas de colágeno tipo I (branca), III (preto), e V (azul). Os domínios amino-terminais nas moléculas de colágeno tipo V parecem ser importantes na regulação do diâmetro de fibrilas de colágeno, que se projetam para a superfície externa da fibrila e presumivelmente bloqueiam maior acréscimo de moléculas de colágeno através de efeitos de impedimento estéricos e/ou eletrostáticos. Observe que as moléculas de colágeno em vista longitudinal (meio) estão alinhados em paralelo, com lacunas entre as moléculas. Além disso, observe que a visão longitudinal (superior) mostra claramente que as extremidades das cadeias alfa em cada molécula de colágeno formam ligações cruzadas intermoleculares com as moléculas de colágeno adjacentes ⁽¹⁶⁵⁾.

A principal manifestação patológica da ES é o acúmulo excessivo de compostos da MEC, especialmente os colágenos I e III ⁽¹⁶⁶⁾. Fibroblastos da pele de pacientes com ES cultivados *in vitro* produzem quantidades excessivas de vários colágenos ^(166, 167, 168) incluindo o colágeno V ⁽³⁸⁾, e apresentam aumento da transcrição dos genes do colágeno ⁽¹⁶⁷⁾. Estes achados refletem o desbalanço entre a produção e a degradação do colágeno. Em relação a isso, as metaloproteinases de matriz (MMPs) são as principais enzimas responsáveis pela degradação dos compostos da MEC e recentemente tem sido demonstrada uma expressão anormal de MMPs na patogênese da ES ^(166, 169). Descreve-se redução da atividade da MMP-9 e dos níveis séricos de MMP-13, sugerindo-se uma contribuição para o estabelecimento de fibrose através da redução da degradação de proteínas da MEC ⁽¹⁶⁶⁾. Níveis elevados de MMP-7 foram associados com um estágio avançado de fibrose pulmonar na ES, sugerindo que a metaloproteinase poderia estar envolvida no processo de remodelação do tecido fibrótico ⁽¹⁷⁰⁾. Conjuntamente, são relatados anticorpos anti MMP-1 em pacientes com esclerodermia localizada ⁽¹⁷¹⁾ e ES ⁽¹⁷²⁾, que poderiam bloquear a atividade de collagenase da MMP-1 e induzir a deposição de colágeno em ambas subtipos da doença ^(171, 172). Ademais, sabe-se que a relação entre as MMPs e seus inibidores teciduais na ES podem influenciar a gravidade da doença, contribuindo para diferentes expressões clínicas da ES de acordo com o padrão de autoanticorpo ⁽¹⁶⁹⁾.

1.8 Autoimunidade e Colágeno V

Colágenos representam uma série de proteínas que estão amplamente relacionadas em termos de propriedades químicas, estrutura e função ⁽¹⁷³⁾. O colágeno V funciona como um componente do citoesqueleto para as células do tecido conjuntivo ⁽¹⁷⁴⁾ e desempenha papel importante nos processos de proliferação e reparação dos tecidos ⁽¹⁴⁰⁾. A importância da sua localização na membrana basal de vasos ⁽¹⁷⁵⁾ implica em assegurar um sítio comum para a montagem de outras fibrilas de colágeno ⁽¹⁴⁶⁾ e regular o estágio inicial da fibrilogênese ⁽¹⁶¹⁾.

O grande interesse no estudo do colágeno V provém da sua peculiar estrutura molecular, que o torna distinto e mais imunogênico do que todos os outros colágenos fibrilares, uma vez que durante a sua síntese, ele conserva seus domínios terminais globulares e telopeptídeos (NH₂ e COOH), porções sabidamente imunogênicas ^(140, 164).

Já se conhece de longa data a relação entre os colágenos e a autoimunidade, em

1974 foram identificados anticorpos contra colágeno humano desnaturado no soro de pacientes com artrite reumatoide (AR) ⁽¹⁷⁶⁾. Em 1983 foram observados anticorpos anti colágeno circulantes no soro de pacientes com ES, demonstrando resultados positivos para os colágenos tipo I, III e IV quando comparado com controles normais ⁽¹⁷⁷⁾. Mais recentemente, descreve-se a ocorrência de anticorpos anti colágeno no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) principalmente contra o colágeno V (70%) e contra o colágeno IV (85%), além de menor proporção em vasculites ⁽¹⁷⁸⁾. Os mesmos autores destacam que os colágenos de membrana basal ou associados à ela podem se tornar imunogênicos em pacientes com LES e vasculites, após dano endotelial secundário ao processo inflamatório inicial da doença de base, e mais ainda, poderiam perpetuar o dano vascular adicional ⁽¹⁷⁸⁾. Mais recentemente tem sido descrita a ocorrência de anticorpos anti COLV em pacientes com ES ⁽¹⁷⁹⁾.

A descoberta de um modelo de esclerose sistêmica no Laboratório de Investigação em Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-17 do HCFMUSP) em coelhos sadios imunizados com COL V tem sido de grande importância na compreensão da autoimunidade nesta grave enfermidade. No estudo de Callado e cols, observou-se em 26 coelhos imunizados, a formação de anti COL V em todos os animais a partir do trigésimo dia de imunização, positividade de anticorpos antinucleares (ANA) com especificidade contra o complexo de Golgi em titulação superior a 1/320 em todos os animais após o septuagésimo quinto dia de imunização, bem como o surgimento de anti Scl70 em todos os animais após os primeiros 30 dias da imunização ⁽¹³⁹⁾.

Em consoante, os autores do modelo experimental de ES induzido por meio da imunização do COLV, postulam que o colágeno tipo V, uma molécula oculta e altamente imunogênica, ao ser exposto e fragmentado, poderia gerar um neo-antígeno, sendo este um dos antígenos responsabilizados por desencadear uma resposta T dependente tipo Th2. Tais neo-antígenos poderiam ativar o sistema imune a produzir anticorpos anti colágeno tipo V que, por sua vez perpetuariam a contínua agressão vascular e síntese de colágeno ^(39, 139, 141, 143).

Trad e cols consideram igualmente a hipótese de que a proliferação celular T *in situ* resulta de uma ativação antigênica específica (MHC/peptídeo), iniciada a partir de um neo-antígeno, sendo este secundário a lesão endotelial precoce observada na ES ⁽⁶⁸⁾.

Outra linha de pesquisa importante a respeito da imunogenicidade do COLV e sua capacidade de induzir autoimunidade diz respeito a um modelo murino de transplante de

pulmão, no qual observou-se que o colágeno tipo V é o centro da resposta imune para aloantígenos e causa de rejeição ^(180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188).

Os estudos em modelo de esclerose sistêmica em coelhos saudáveis imunizados com COL V do grupo brasileiro LIM-17 do HCFMUSP, bem como as pesquisas com COL V em modelos murinos e pacientes com transplantes pulmonares descritos pelo grupo de Wilkes ⁽⁷⁰⁾ entre outros pesquisadores, ocorreram de modo independente.

Considera-se que o COLV é o que tem menor proporção dentre os colágenos encontrados nos diferentes tecidos e encontra-se geralmente intercalado com o tipo I, o mais prevalente ^(180, 181, 184, 185, 186). Embora em menor quantidade, o COLV é considerado como uma molécula oculta entre os colágenos dos tipos I e III, e usualmente se localiza nos tecidos conjuntivos perivasculares e peribronquiolares, que são os mesmos sítios de atividade de rejeição pulmonar após transplantes ^(180, 184, 185). Contudo, em resposta a uma injúria, como a que ocorre na isquemia de reperfusão durante o procedimento de transplante, possivelmente fragmentos antigênicos de COLV poderiam ser liberados localmente ^(180, 182, 184). Após capturados por células apresentadoras de antígenos, esses fragmentos funcionariam como neo-antígenos e ativariam as células T, induzindo uma resposta celular específica, responsável pela rejeição de pulmões transplantados ⁽¹⁸⁰⁾.

Durante o processo de rejeição ao enxerto, a resposta inflamatória a uma lesão pode induzir a atividade das metaloproteinases (MMPs), que são capazes de degradar o COLV, resultando na liberação potencial de fragmentos antigênicos de colágeno V. De fato, foi demonstrada em modelos murinos de rejeição a transplante pulmonar uma expressão aumentada de MMP2 e MMP9 ⁽¹⁸⁰⁾. Também já foi demonstrada a expressão de uma metaloproteinase que degrada o colágeno nativo tipo V e colágenos desnaturados em cultura de macrófagos alveolares humanos ⁽¹⁸⁹⁾. Devido sua localização pericelular, o COLV é importante na comunicação da matriz celular e sua depleção pode acarretar processos anormais de reparação após eventos inflamatórios ^(180, 189).

A causa mais comum de insucesso no transplante pulmonar advém de um processo de oclusão fibro-obliterativo das pequenas vias aéreas, denominado síndrome de bronquiólite obliterante (BO). Estudo prospectivo de 7 anos demonstrou que uma resposta vigorosa e específica contra o COLV foi associada com substancial aumento na incidência e gravidade da BO. As respostas específicas ao COLV foram dependentes igualmente de células T CD4⁺ e monócitos, bem como da presença de IL-17, TNF- α e IL-1 β ⁽¹⁸¹⁾, mas não de IFN- γ ⁽¹⁸⁵⁾. Estudo recente revelou que 2 anos antes do desenvolvimento de BO, os pacientes

futuros candidatos a transplante pulmonar já apresentavam anticorpos contra ambas cadeias alfa 1 e 2 do COLV, além de imunodominância de 5 peptídeos de COLV (6, 7, 9, 11 e 14) que se ligavam ao HLA-DR4 e DR7, induzindo produção de IL-10. Porém, durante o diagnóstico clínico de BO após o transplante, observou-se uma resposta de anticorpos restrita a cadeia alfa 1 e houve uma mudança dos determinantes antigênicos do COLV (peptídeos 1, 4 e 5), que induziram a resposta através de IL-17 e IFN- γ , mas não de IL-10⁽¹⁸⁷⁾. A introdução local de IL-10 parece prevenir a rejeição de transplantes em camundongos⁽¹⁸⁸⁾.

Com a finalidade de esclarecer a ocorrência de rejeição muito precoce do pulmão no período pós-transplante, estudou-se a imunidade celular específica ao COLV em pacientes que estavam aguardando o transplante pulmonar e descobriu-se notavelmente que quase 60% dos pacientes com fibrose pulmonar idiopática já apresentavam uma resposta de hipersensibilidade tardia ao COLV antes de receber o transplante⁽¹⁸²⁾. Acredita-se ainda que a rejeição precoce poderia ocorrer através da interação de células T derivadas do receptor com células apresentadoras de antígeno (APCs) do pulmão do doador^(182, 183). De fato, o pulmão é rico em APCs como monócitos/macrófagos e a depleção destas células no pulmão doado antes do transplante foi associado com redução da produção local de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α ⁽¹⁸³⁾.

A transferência passiva de anticorpos anti colágeno V em modelos murinos acarretou lesão pulmonar, embora não se tenha evidenciado depósito de complemento C4d no endotélio vascular. Haque e colaboradores, bem como outros autores já haviam relatado que a rejeição aguda e crônica ao enxerto pulmonar pode ser prevenida por meio da indução de tolerância oral ao COLV em modelos murinos^(183, 184, 185, 186).

Variadas linhas de pesquisa vêm demonstrando a importante participação do COLV no desencadeamento de processos autoimunes e de indução à fibrose. Descreve-se a associação direta entre a diminuição da quantidade de COLV e a redução da apoptose celular em um modelo murino de carcinogênese pulmonar⁽¹⁹⁰⁾. Se por um lado o decréscimo na apoptose favorece o aumento de células cancerígenas, por outro, igualmente beneficia o surgimento de doenças autoimunes. Ademais, foi relatado um aumento na expressão de COLV na pancreatocolangite autoimune que poderia refletir um distinto mecanismo subjacente para o desenvolvimento de fibrose⁽¹⁹¹⁾ e encontrou-se a associação positiva entre a elevação sérica de fragmentos de COLV e a extensão da deposição de colágeno em dois modelos diferentes de fibrose do fígado⁽¹⁹²⁾. Anticorpos reagindo com proteínas da MEC têm sido extensivamente estudados recentemente em diversas doenças autoimunes do tecido

conjuntivo, na oftalmopatia associada à tireoidopatia foram descritos anticorpos anti colágeno V com reatividade antígeno específica, dentre outros, os quais poderiam representar um papel na inflamação do tecido conjuntivo da órbita ⁽¹⁹³⁾.

1.9 Justificativa do estudo e Hipótese do COLV na etiopatogênese da ES

A descoberta de um modelo de esclerose sistêmica no Laboratório de Investigação em Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-17 do HCFMUSP) em coelhos sadios imunizados com COL V é de grande importância na compreensão da patogênese desta grave enfermidade. O modelo reproduz de forma inédita todos os aspectos fundamentais da ES como fibrose, vasculopatia e autoimunidade ⁽¹³⁹⁾.

De forma surpreendente, verificou-se que aspectos histopatológicos encontrados no modelo eram também vistos na enfermidade humana. Neste sentido, demonstrou-se a presença de fibras de colágenos de morfologias anômalas, encontradas engrossadas, distorcidas e em quantidade aumentada em todos os tecidos habitualmente acometidos na ES. Estudos imunohistoquímicos e de microscopia eletrônica demonstraram que o responsável pela modificação da estrutura fibrilar era o colágeno tipo V ^(39, 179).

Habitualmente, o COL V é encontrado em pequenas quantidades na forma de fibrilas delgadas, que em conjunto com os colágenos tipos I e III compõem as fibras heterotípicas, responsáveis pela sustentação e propriedades físicas da matriz extra celular. A presença de fibras heterotípicas anômalas pode originar tecido conjuntivo com propriedades físicas diferentes do habitual, como por exemplo, tecido com características rígidas, devido à mudança da histoarquitetura dos colágenos. Este aspecto tissular é encontrado na ES especialmente na fase aguda e proliferativa da enfermidade ^(39, 138, 179).

Extraordinariamente, verificou-se que fibroblastos teciduais e os cultivados *in vitro*, obtidos do modelo experimental em coelhos ou humanos, por razões ainda desconhecidas, perdem a capacidade autoregulatória de inibir a síntese de colágenos cessado os estímulos, mantendo a síntese desordenada e aumentada de COL V anômalo ⁽¹⁹⁴⁾. Recentemente, foi descoberto que a síntese exacerbada de COL V em tecidos ocorria especialmente na fase precoce da ES e esteve relacionada com a atividade clínica da esclerodermia ⁽¹⁷⁹⁾.

Pesquisadores do LIM-17 do HCFMUSP, tem procurado entender como a

imunização de coelhos saudáveis com COL V teriam originado um modelo de esclerodermia. É curioso que após 7 dias do início da imunização já era possível identificar aumento do colágeno na derme do animal ⁽³⁹⁾. Este fenômeno precoce certamente independe da resposta imune adquirida e só poderia ser justificado pela ação direta de fragmentos do COL V provenientes da imunização, sobre células endoteliais ou em decorrência da imunidade adaptativa. Interessante reportar que, estudos de Marangoni mostraram que aos 7 dias já era possível identificar apoptose de células endoteliais ⁽¹⁹⁵⁾.

Contudo, este aumento precoce da síntese de colágeno matricial ocorrida precocemente não poderia ser explicada apenas pela ação direta do COL V inoculado, uma vez que houve perpetuação da síntese aumentada de colágenos, mesmo após o término das imunizações. Mais ainda, demonstrou-se que os coelhos apresentavam hipocomplementemia e presença de imunocomplexos após término das imunizações ⁽¹³⁹⁾. Este curioso comportamento sugere que o COL V seria um agente indutor de autoimunidade, contribuindo na manutenção dos danos matriciais. Neste modelo, a emergência da autoimunidade já havia sido constatada pelo surgimento de autoanticorpos como anti Scl 70 e anticorpos contra componentes do aparelho de Golgi ⁽¹³⁹⁾.

Assim, foi sugerido que a imunização com COL V originaria a formação de complexos imunes constituídos de COL V-anti COL V, que ao se depositarem na camada endotelial, lesariam as células endoteliais e a membrana basal subjacente, possivelmente com a participação do sistema complemento. A seguir, este dano do complexo endotélio-membrana basal promoveria a invasão matricial pelas células inflamatórias circulantes, que por sua vez, causariam a destruição de componentes matriciais como as fibrilas e a substância fundamental, através de digestão enzimática. Neste ponto, convém salientar que habitualmente, o COL V encontra-se oculto, entre as fibras de colágenos dos tipos I e III, compondo as fibras heterotípicas. A exposição por ação enzimática dos sítios antigênicos ocultos do COL V, originaria a emergência de neoantígenos (antígenos *self*), que seriam os responsáveis pela perpetuação da resposta imunológica. Assim, o processo inflamatório imunológico inicialmente induzido por COL V exógeno, poderia estar perpetuada pela exposição do COL V endógeno inicialmente oculto ⁽¹⁷⁹⁾.

Fragmentos do COL V endógeno, continuamente expostos pelo processo inflamatório, ativariam células Th2, induzindo síntese de citocinas pró-fibróticas e estimulando os linfócitos B a produzirem autoanticorpos, originando deste modo um modelo de autoimunidade compatível com esclerose sistêmica ^(179, 195).

Adicionalmente, epítomos emergentes de COL V exógenos (estágio inicial) ou endógenos (estágio tardio), poderiam atuar diretamente sobre as células endoteliais promovendo apoptose celular. A camada de células endoteliais e a membrana basal, podem ser igualmente agredidas, pelo surgimento de imunocomplexos, formados por fragmentos de COL V endógeno e anti COL V, com afluxo constante de células inflamatórias e ativação de metaloproteases ⁽¹⁹⁴⁾. Este conjunto de eventos contribuiria na manutenção do dano matricial e agressão contínua do complexo endotélio-membrana basal ⁽¹⁷⁹⁾.

Pesquisas conduzidas no LIM-17 do HCFMUSP, mostraram que esta ação danosa dos imunocomplexos e/ou ação direta do COL V sobre as células endoteliais, determinam a síntese aumentada de mediadores inflamatórios pró-fibróticos como endotelina-1, TGF beta, CTGF e diferentes agentes vasoativos. Estes mediadores são os principais responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas encontradas na ES, como a síntese exacerbada de colágenos e espessamento da camada íntima e oclusão vascular ^(179, 195).

A autoimunidade presente no modelo experimental de ES induzido por imunização com COL V, pode ser justificada, uma vez que fragmentos endógenos do COL V expostos ao sistema imunológico, em especial o sistema Th2, promoveria síntese de citocinas como IL-4, mediador responsável pela ativação de fibroblastos e síntese de autoanticorpos. Para demonstrar que epítomos expostos do COL V, atuam como antígenos específicos desencadeadores da ES em coelhos, foi proposta pesquisa objetivando a promover a indução da tolerância nasal ao COL V nos coelhos imunizados. Demonstrou-se que animais com ES experimental, tiveram as alterações histológicas e as citocinas inflamatórias normalizadas após o tratamento de tolerância nasal com COL V ^(142, 143).

Estudos conduzidos no LIM-17 HCFMUSP sugerem de forma inédita a participação de antígenos próprios na patogênese da ES animal e humana. Admite-se que, diferentes formas de agressões, desde que prolongadas e suficientes para promover danos na camada endotélio-membrana basal, com exposição dos componentes da matriz extracelular ao sistema imunológico, poderiam originar autoimunidade com características histológicas, clínicas e laboratoriais compatíveis com esclerose sistêmica. O COL V endógeno, habitualmente encontrado oculto seria o antígeno próprio mais promissor no desencadeamento da ES ^(39, 40, 138, 139, 141, 142, 143, 179).

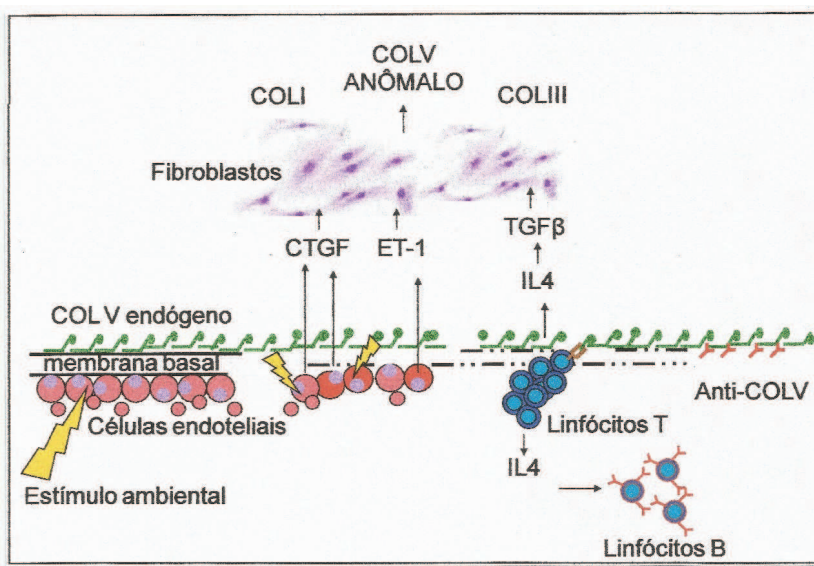
Neste sentido, esta teoria serve de embasamento para justificar o porquê de diferentes substâncias tóxicas como bleomicina, sílica, cloreto de vinil, solventes industriais, óleo de couza e infecções prolongadas poderem desencadear quadros clínicos compatíveis

com ES ^(5, 17, 27). Estes agentes podem atuar sobre o endotélio ou epitélio brônquico, levando ao dano vascular ou brônquico, originando o processo inflamatório e imunológico ⁽¹⁹⁵⁾. Interessante observar que os pesquisadores do LIM-17 admitem que o processo inicial da ES pode se iniciar tanto em vasos, como no sistema respiratório ^(179, 195).

Desde que fatores ambientais sejam considerados como fundamentais na patogênese da ES, é possível admitir que possam ocorrer variações fenotípicas na apresentação da ES conforme as diferentes regiões geográficas ^(15, 18). Outro aspecto importante, mas pouco abordado, é o de conhecer a real relevância da presença do anti COL V nos pacientes com ES. Sabe-se que, animais do modelo de ES induzido por COL V, desenvolvem anticorpos contra COL V desnaturado, mas não contra o nativo ⁽¹³⁹⁾. É desconhecida a importância do anti COL V em pacientes com ES.

O objetivo da tese é o de conhecer as características clínicas e laboratoriais da população de ES na região de Campo Grande, MS e a de analisar a eventual relevância da presença de anti COL V neste grupo de pacientes, correlacionando com a gravidade e atividade da doença, bem como a qualidade de vida dos pacientes.

O mecanismo patogênético da ES proposto pelo LIM-17 do HCFMUSP se encontra resumido na Figura 3 abaixo ⁽¹⁷⁹⁾:



Fonte: Martin P. 2012

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as características sócio demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com ES do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da FMUFMS, Campo Grande - Mato Grosso do Sul e correlacionar a presença do anticorpo anti colágeno tipo V (anti COL V) com aspectos clínicos e laboratoriais da enfermidade.

2.2 Específicos

- correlacionar a positividade do anti COL V com a de outros autoanticorpos específicos presentes na ES;
- correlacionar a positividade do anti COL V com os índices de atividade da ES;
- correlacionar a positividade do anti COL V com os índices de gravidade da ES.

3. METODOLOGIA

3.1- Descrição do Estudo

Trata-se de um estudo observacional, do tipo analítico e de delineamento transversal, com análise prospectiva dos dados dos pacientes.

3.2- Seleção dos Pacientes

a- A pré-seleção que foi constituída por 72 pacientes com diagnóstico de ES, foi feita a partir do levantamento dos Prontuários Médicos, do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FMUFMS).

b- A partir dos critérios de inclusão (descritos abaixo), os pacientes foram selecionados aleatoriamente no ambulatório de esclerose sistêmica/esclerodermia e outras doenças do colágeno do Serviço de Reumatologia da FMUFMS.

c- Foram selecionados todos os pacientes que concordaram em participar da pesquisa durante o período de Janeiro a Dezembro de 2013, totalizando 60 indivíduos com diagnóstico de esclerose sistêmica, segundo critérios expostos abaixo.

O tipo de amostragem de conveniência foi utilizado por não existir nenhum dado publicado sobre incidência e prevalência da patologia na população brasileira, uma vez que se trata de doença rara. Considerando os dados demográficos mais recentemente publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) ⁽¹⁹⁶⁾, cuja população estimada no município foi de 786.797 habitantes, e a despeito de diversos vieses, poderia se considerar apenas para cálculo de seleção, uma taxa de prevalência dos pacientes com ES procedentes de Campo Grande - MS de 5,71 casos por 100.000 habitantes, semelhante ao observado nos Estados Unidos ⁽¹⁹⁷⁾ (5,6 por 100.000 habitantes) e Inglaterra ⁽¹⁹⁸⁾ (8,8 por 100.000 habitantes).

d- Do total de 60 pacientes, os grupos foram divididos em 4 grupos, constituídos respectivamente por 26 pacientes com a forma limitada da doença, 20 pacientes com a forma

difusa, 7 pacientes com a forma precoce e 7 indivíduos com síndromes de sobreposição com outras doenças do colágeno.

e- O grupo controle foi constituído de indivíduos saudáveis, doadores de sangue, sendo 21 mulheres e 5 homens, com idade média de 40,34 anos.

f- Os pacientes para serem selecionados, deveriam obedecer aos seguintes critérios:

Critérios de Inclusão dos pacientes:

- Preencher os Critérios diagnósticos para ES do ACR de 1980 ⁽¹⁹⁹⁾ e/ou os critérios de classificação de 2013 para ES ⁽²⁰⁰⁾ (Quadros 1 e 2 localizados nos itens 3.7.1 e 3.7.2);
- No caso de não apresentarem endurecimento cutâneo, deveriam preencher os critérios de ES precoce de LeRoy e Medsger de 2001 ⁽²⁰¹⁾ (Quadro 3 - item 3.7.3);
- Terem assinado o termo de consentimento previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (Apêndice 1).

Critérios de exclusão:

- Pacientes analfabetos ou com dificuldade intensa em compreender os questionários que foram aplicados;
- Pacientes gestantes ou indígenas;
- Pacientes que apresentavam outras doenças infecciosas associadas ou neoplasias malignas.

3.3- Coleta dos dados

Na primeira consulta foram colhidos dados demográficos e clínicos, incluindo tempo de doença, ano de diagnóstico, escore cutâneo de Rodnan modificado ⁽²⁰²⁾, pesquisa de autoanticorpos, exame clínico completo e tratamento atual (Apêndice B).

As informações necessárias para a caracterização sócio demográfica e clínica da doença, foram obtidas a partir dos registros médicos contidos nos prontuários de cada

paciente e complementadas com duas entrevistas do paciente, sendo o tempo entre as entrevistas de 6 meses.

O escore cutâneo de Rodnan modificado é realizado através da palpação de 17 áreas do corpo, incluindo dedos das mãos, mãos, antebraços, braços, pés, pernas e coxas de forma bilateral, além de face, tórax anterior e abdômen. O endurecimento cutâneo é graduado em uma escala que varia de 0 (normal) a 3 (grave), obtendo-se variação do escore cutâneo entre 0 a 51, de acordo com a soma dos pontos de cada área examinada⁽²⁰²⁾ (Quadro 4 - item 3.7.4).

Dados específicos sobre os critérios de gravidade de Medsger^(203, 204) e critérios de atividade de Valentini^(205, 206, 207, 208, 209) da doença foram coletados em formulários específicos na avaliação inicial e após 6 meses (respectivamente Quadro 5 - item 3.7.5 e Quadro 6 - item 3.7.6). O *Scleroderma Health Assessment Questionnaire* (sHAQ)^(210, 211, 212) também foi colhido na avaliação inicial do paciente e na segunda avaliação (Quadro 7 e 8 - itens 3.7.7 e 3.7.8).

3.4- Amostras de Soro

a- Foram utilizados para a realização da pesquisa, soros dos pacientes previamente selecionados, que foram coletados na primeira entrevista, adequadamente congelados a -50 °C e armazenados no Laboratório do Hospital Universitário da UFMS. Foi realizada uma nova coleta dos soros dos mesmos pacientes após 6 meses da entrevista inicial. Os soros de controles normais foram armazenados da mesma forma e analisados somente em relação à positividade ou não para o anticorpo anti colágeno tipo V.

b- Os soros no momento da realização dos exames, foram descongelados e divididos em alíquotas.

c- os soros foram submetidos à pesquisa de anticorpos antinucleares, anticorpo anti colágeno tipo V e outros autoanticorpos.

3.5- Pesquisa dos Autoanticorpos

Os exames laboratoriais básicos foram realizados no Laboratório do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FMUFMS). Os autoanticorpos específicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do Hospital São Paulo do Serviço de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A pesquisa do Anticorpo anti colágeno tipo V foi realizado no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Reumatologia da Universidade de São Paulo (USP).

a- Anticorpos Antinucleares (ANA)

Foi utilizada a técnica de Imunofluorescência Indireta para a pesquisa do ANA e tendo como substrato as células HEp2 (técnica de Faar) e utilizado os critérios do II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em células Hep-2 (2003) ⁽²¹³⁾, para a interpretação dos resultados. Os soros foram considerados positivos se o título fosse maior ou igual a 160 e diluídos até obter-se a negatificação da fluorescência.

b- Pesquisa de anti DNA (dupla hélice ou nativo), anti Sm, anti RNP, anti Ro (SSA), anti La (SSB), anticentrômero, anti DNA topoisomerase 1 (anti Scl70) anticardiolipina IgM e IgG.

Anti DNA – Foi utilizada como substrato a *Crithidia luciliae* e utilizada técnica de imunofluorescência indireta (IFI), como descrita anteriormente por Aarden ⁽²¹⁴⁾.

Para a pesquisa de anti Sm, anti RNP, anti Ro (SSA) e anti La (SSB) – Foi utilizada técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA), como previamente descrita por McClain ⁽²¹⁵⁾, utilizando-se kits específicos de substrato para cada teste, seguindo-se as especificações do fabricante. (Hemagen Diagnostics, Inc). Foi considerado positivo o soro que tivesse 3 vezes acima do *Cut-off*.

c- Para a pesquisa de anticentrômero – Foi utilizada a técnica de IFI, tendo como substrato as células HEp2 conforme os critérios do II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em células Hep-2 (2003) ⁽²¹³⁾, para a interpretação dos resultados.

d- Para a pesquisa de anti DNA topoisomerase 1 (anti Scl70) – Foi utilizada técnica de ELISA como previamente descrita ⁽²¹⁶⁾, considerando não reagente se < 20 unidades, fracamente reagente entre 20 e 39 unidades, moderadamente reagente entre 40 e 80 unidades e fortemente

reagente (valores elevados) se > 80 unidades. Foi utilizado kit específico QUANTA Lite™ Scl-70 do Laboratório INOVA (INOVA Diagnostics, Inc; San Diego, CA, USA), seguindo-se as especificações do fabricante.

e-Anti cardiolipina IgM e IgG – Foi utilizada técnica de ELISA, considerando positivo se o título fosse maior que 30,0U i/ml para IgG e maior que 15,0Ui/ml para IgM. O substrato utilizado foi a solução de cardiolipina purificada do Laboratório Sigma e técnica como descrita anteriormente por Gharavi ⁽²¹⁷⁾.

f- Anticorpo anti RNA polimerase III – Foi utilizada técnica de ELISA como previamente descrita ⁽²¹⁸⁾:

Todos os reagentes e amostras encontravam-se à temperatura ambiente (20-26°C) e foram homogeneizados. Foi diluída a solução de lavagem HRP 1:40, adicionando o conteúdo do frasco de solução de lavagem HRP à 975ml de água destilada. Foi preparada uma diluição de 1:100 de cada amostra do paciente, adicionando 5µl de amostra a 500µl de diluente da amostra HRP. Para determinação da presença ou ausência de anti POL 3 foram utilizados dois poços para cada um dos três controles e dois poços para cada amostra.

Foram adicionados 100µl do positivo baixo RNA Pol III ELISA, do positivo alto RNA Pol III ELISA, do controle negativo ELISA pré-diluídos e das amostras diluídas dos pacientes nos respectivos poços. Os poços foram vedados e foi efetuada, numa superfície nivelada, a incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após aspiração do conteúdo de cada poço, foi adicionado 200-300µl de solução de lavagem HRP diluída a todos os poços e, em seguida, novamente aspirado. Foi repetida esta sequência mais duas vezes num total de três lavagens. Depois da última lavagem, foi invertida a placa e colocada sobre um papel absorvente para que fosse retirado qualquer líquido residual.

Foi adicionado 100µl do conjugado HRP IgG a cada poço e novamente realizada a incubação dos poços durante 30 minutos. Posteriormente foi repetido o procedimento de lavagem como descrito anteriormente.

Foi então adicionado 100µl do cromogênio TMB a cada poço e feita incubação durante 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 100µl de solução de interrupção HRP a cada poço e a placa foi levemente agitada a fim de se obter uma mistura homogênea nos poços.

Foi determinada a densidade óptica (DO) de cada poço a 450 nm no prazo de 1 hora após a interrupção da reação. Foram considerados negativos os valores < 20 unidades, fracamente

reagentes entre 20 e 39 unidades, moderadamente reagentes entre 40 e 80 unidades e fortemente reagentes (valores elevados) se > 80 unidades.

g- Anticorpo anti colágeno tipo V – Foi utilizada técnica de ELISA como previamente descrita com modificações⁽¹³⁹⁾. Resumidamente, a técnica utilizada foi a seguinte:

Para o preparo do antígeno usou-se o colágeno tipo V (Sigma Co, catálogo código C3657).

Assim, 1 mg do COL V foi diluído em 950µl de ácido acético 0,01N e dissolvido sob agitação em vortex.

A seguir adicionou-se 50µl de mercapto-etanol e a solução fervida por 5min. Este passo objetivou quebrar a macromolécula do COL V em fragmentos menores, ao exemplo do que ocorre no animal inoculado com esta proteína.

Na etapa seguinte, 200µl do antígeno acima preparado na concentração de 1 mg/ml, foi adicionado a 9,8 ml de tampão carbonato. Sensibilizou-se cada um dos 96 poços da placa Immulon 1B com 100µl da solução e a placa incubada “*overnight*” a 4 C.

As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 0,05%, secas e guardadas embrulhadas em papel alumínio a -20° C até o uso.

No dia do ensaio, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e a seguir bloqueadas com 150µl/poço com PBS-BSA 1% durante 1 hora à temperatura ambiente. A seguir lavou-se as placas três vezes com PBS-Tween 0,05%.

Os soros controles de indivíduos normais e de pacientes com ES foram diluídos 1/50 e adicionados em duplicada nas placas e incubados por 1 hora e 30 min, em câmara úmida à temperatura ambiente. O soro controle positivo foi o proveniente da imunização do coelho com COL V e foi utilizado na diluição de 1/400.

As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 0,05%. Adicionou-se 100µl do conjugado anti IgG humano (Sigma código A 8542) ou anti IgG de coelho no caso do controle positivo (Sigma código A 3687) e as placas incubadas por 1 hora em câmara úmida na temperatura ambiente.

Após 3 lavagens das placas com PBS-Tween 0,05%, adicionou-se o revelador p-nitrofenil dissódico (Sigma código N 2765) na concentração de 1 mg/ml diluído em tampão glicina. Adicionou-se 100µl do revelador em cada um dos poços e aguardou-se até que o controle positivo atingisse DO 1,0, leitura realizada com comprimento de onda de 405 nm.

Considerou-se valores positivos, aquelas DOs superiores à média mais três desvios padrões de 8 amostras de soros oriundos de controles normais.

3.6- Análise Estatística

Utilizou-se o cálculo da mediana para os dados sócios demográficos.

Determinou-se a prevalência dos autoanticorpos na sua totalidade e de cada um deles, nas amostras dos soros dos pacientes da pesquisa e comparados com os dados da literatura. Foi feita a correlação entre a prevalência dos anticorpos encontrados nos soros dos pacientes desta pesquisa, com os critérios de atividade e critérios de gravidade da ES.

A avaliação da correlação linear entre o *sHAQ* e a atividade da doença foi realizada por meio do teste de correlação linear de Pearson. Já a comparação entre os pacientes com resultado negativo para o anticorpo anti colágeno V, com aqueles com resultado positivo para este anticorpo, em relação às variáveis *sHAQ*, escore na escala de gravidade, escore na escala de atividade, tempo da doença e valor da PSAP, foi realizada por meio do teste t-student. O mesmo teste foi utilizado na comparação entre pacientes com a forma da doença difusa e aqueles com a doença limitada, em relação às variáveis quantitativas avaliadas neste estudo. O teste exato de Fisher foi utilizado na avaliação da associação entre os resultados para o anticorpo anti colágeno V e a variável presença crise renal. O teste do qui quadrado ou o teste exato de Fisher foi utilizado na avaliação da associação entre as formas da doença (difusa e limitada), com as variáveis qualitativas mensuradas neste estudo. Os resultados das demais variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “software” SPSS, versão 20.0, considerando um nível de significância de 5%.

3.7- Instrumentos de Avaliação

3.7.1- Critérios de Classificação do ACR / EULAR 2013 para diagnósticos de ES ⁽²⁰⁰⁾

Pacientes com escore total de 9 ou mais pontos são classificados como portadores de ES definitiva ⁽²⁰⁰⁾.

Quadro 1: Diagnóstico de ES pelos critérios do ACR / EULAR de 2013.

Item	Sub item	Peso / escore
Endurecimento cutâneo dos dedos de ambas as mãos estendendo-se de forma proximal às articulações metacarpofalangeanas (Critério suficiente)	-	9
Endurecimento cutâneo dos dedos (contar apenas o maior escore)	Dedos edemaciados	2
	Esclerodactilia dos dedos (distal às metacarpofalangeanas mas proximal às articulações interfalangeanas)	4
Lesões de polpa digital (contar apenas o maior escore)	Úlceras de polpa digital	2
	Cicatrizes de polpas digitais	3
Telangiectasia	-	2
Anormalidades na capilaroscopia periungueal	-	2
Hipertensão arterial pulmonar e/ou doença intersticial pulmonar (escore máximo é 2)	Hipertensão arterial pulmonar	2
	Doença intersticial pulmonar	2
Fenômeno de Raynaud	-	3
Autoanticorpos específicos da ES (anticentrômero, anti topoisomerase I, anti RNA polimerase III) (escore máximo é 3)	Anticentrômero	3
	Anti topoisomerase I (anti Scl70)	3
	Anti RNA polimerase III	3

Fonte: Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A et al. 2013

3.7.2- Critérios Diagnósticos de ES pelo American College of Rheumatology (ACR) (199).

A ES pode ser dividida em subtipos e tem critérios de classificação propostos pelo ACR ⁽¹⁹⁹⁾. Para o diagnóstico da ES é necessária a presença do critério maior ou, na sua ausência, de dois critérios menores. Estes critérios mostraram sensibilidade de 97% e especificidade de 98% (Quadro 2).

Quadro 2: Critérios Diagnósticos de ES pelo ACR de 1980.

Critério maior 1. Esclerodermia proximal
Critérios menores 1. Esclerodactilia 2. Úlceras ou microcicatrices ou perda de substância de polpas digitais 3. Fibrose pulmonar bibasal

Fonte: Masi AT, Rodnan GP, Medsger Jr, TA et al.1980

3.7.3- Critérios Diagnósticos de ES precoce propostos por LeRoy e Medsger ⁽²⁰¹⁾.

No entanto, uma grande fração dos pacientes não preenche os critérios do ACR. Por este motivo, recentemente foram propostos outros critérios de diagnóstico (Quadro 3). Neste a presença de fenômeno de Raynaud associado a alterações na capilaroscopia periungueal e/ou presença de autoanticorpos específicos determinam a esclerose sistêmica precoce, conforme proposta de LeRoy e Medsger ⁽²⁰¹⁾.

Quadro 3: Critérios Diagnósticos de ES precoce propostos por LeRoy e Medsger de 2001.

1. Fenômeno de Raynaud Observação direta de dois dos itens abaixo: a. Palidez (bem demarcada em região acral) b. Cianose (arroxamento de extremidades que desaparece com aquecimento) c. Hiperemia (rubor de extremidades bem demarcada) OU 2. Documentação objetiva de hiper-reatividade ao frio por: a. Evidencia objetiva de recuperação retardada após estímulo frio b. Teste de Nielsen ou equivalente positivo E 3. Microangiopatia SD à capilaroscopia periungueal (capilares ectasiados e desvascularização capilar) OU 4. Presença de autoanticorpos seletivos para esclerose sistêmica (anticentrômero, anti Scl70, antifibrilarina, anti Pm/Scl, anti RNA polimerase I ou III)

Fonte: LeRoy EC, Medsger Jr. TA. 2001

3.7.4- Escore cutâneo de Rodnan modificado ⁽²⁰²⁾.

Calcular o ESCORE pela soma de todas as 17 áreas avaliadas.

A. Avaliar o endurecimento da pele pela palpação:

0 = normal

1 = Discretamente endurecida

2 = Moderadamente endurecida

3 = Gravemente endurecida (impossível de pinçar)

B. Superfície das áreas anatômicas avaliadas (N = 17)

Quadro 4: Avaliação do endurecimento da pele pelo escore de Rodnan modificado.

DIREITO					ESQUERDO			
0	1	2	3	DEDOS MÃOS ANTEBRAÇOS BRAÇOS	0	1	2	3
0	1	2	3		0	1	2	3
0	1	2	3		0	1	2	3
0	1	2	3		0	1	2	3
				FACE TÓRAX ABDOME	0	1	2	3
					0	1	2	3
					0	1	2	3
0	1	2	3	COXAS PERNAS DORSO DOS PÉS	0	1	2	3
0	1	2	3		0	1	2	3
0	1	2	3		0	1	2	3

Fonte: Sampaio-Barros PD, Samara AM, Marques Neto JF. 2004

3.7.5- Critérios de gravidade da ES propostos por Medsger ^(203, 204).

Quadro 5: Critérios de gravidade da ES propostos por Medsger.

ESCALA DE GRAVIDADE DA DOENÇA NA ESCLEROSA SISTÊMICA	
1) Sintomas gerais ☐ 0 = Normal ☐ 1 = Perda peso 5.0-9.9 kg / Ht 33.0-36.9 % ☐ 2 = Perda peso 10-14.9 kg / Ht 29.0-32.9% ☐ 3 = Perda peso 15-19.9 kg / Ht 25.0-28.9% ☐ 4 = Perda peso > 20.0 kg / Ht < 25.0%	6) Trato digestivo ☐ 0 = Normal ☐ 1 = Hipoperistalse do esôfago distal; Hipoperistalse do intestino delgado ☐ 2 = Aperistalse do esôfago distal; uso antibióticos para supercrescimento bacteriano ☐ 3 = Síndrome de malabsorção; episódios de pseudo-obstrução intestinal ☐ 4 = Necessidade de nutrição parenteral
2) Vascular periférico ☐ 0 = Normal ☐ 1 = Fenômeno de Raynaud, requerendo uso de vasodilatadores ☐ 2 = Microulceração de polpas digitais ☐ 3 = Úlcera de polpas digitais ☐ 4 = Gangrena digital	7) Pulmões ☐ 0 = Normal ☐ 1 = Difusão CO 70 - 80%; CVF 70 - 80%; estertores; fibrose radiológica ☐ 2 = Difusão CO 50 - 69%; CVF 50 - 69%; hipertensão pulmonar leve ☐ 3 = Difusão CO < 50%; CVF < 50%; hipertensão pulmonar moderada a grave ☐ 4 = Necessário uso de oxigenioterapia
3) Pele ☐ 0 = ECT 0 ☐ 1 = ECT 1 - 14 ☐ 2 = ECT 15 - 29 ☐ 3 = ECT 30 - 39 ☐ 4 = ECT > 40	8) Coração ☐ 0 = Normal ☐ 1 = Defeito condução ao ECG; Fração de ejeção VE 45 - 49% ☐ 2 = Arritmia sintomática; Alargamento VD e VE; Fração de ejeção VE 40 - 44% ☐ 3 = Fração de ejeção VE < 40% ☐ 4 = Insuficiência cardíaca congestiva
4) Articulações/tendões ☐ 0 = Distância ponta digital-palma 0-0.9 cm ☐ 1 = Distância ponta digital-palma 1-1.9 cm ☐ 2 = Distância ponta digital-palma 2-3.9 cm ☐ 3 = Distância ponta digital-palma 4-4.9 cm ☐ 4 = Distância ponta digital-palma > 5.0 cm	9) Rins ☐ 0 = Normal ☐ 1 = Creatinina sérica 1.3 - 1.6 mg/dl; proteinúria ++ ☐ 2 = Creatinina sérica 1.7 - 2.9 mg/dl; proteinúria 3+/ 4+ ☐ 3 = Creatinina sérica > 3mg/dl ☐ 4 = Necessidade de diálise
5) Muscular ☐ 0 = Sem fraqueza proximal ☐ 1 = Fraqueza muscular proximal, leve ☐ 2 = Fraqueza muscular proximal, moderada ☐ 3 = Fraqueza muscular proximal, intensa ☐ 4 = Fraqueza muscular proximal, intensa; necessário auxílio para deambulação	
Pontuação _____ Data ____/____/____ Paciente _____ Registro _____ Centro _____	

Traduzido a partir de: Medsger TA Jr, Silman AJ, Steen VD, et al. A disease severity scale for systemic sclerosis: development and testing. J Rheumatol 26: 2159-67, 1999.

Fonte: Medsger Jr TA, Silman AJ, Steen VD et al. 1999

3.7.6- Critérios de atividade de ES propostos por Valentini ^(205, 206, 207, 208, 209).

Quadro 6: Critérios de atividade de ES propostos por Valentini.

ÍNDICE DE ATIVIDADE DO EScSG	
Item	Escore
Escore de Rodnan modificado (mRSS > 14)	1,0
Escleredema	0,5
Delta-pele*	2,0
Necrose digital	0,5
Delta-vascular*	0,5
Artrite	0,5
DLCO < 80%	0,5
Delta-coração-pulmão*	2,0
VHS > 30 mm na primeira hora	1,5
Hipocomplementenemia	1,0
Índice total de atividade de doença	10,0

EScSG = European Scleroderma Study Group; DLCO = Difusão de Monóxido de Carbono;
VHS = Velocidade de Hemossedimentação.

* Piora orgânica relevante referida pelo paciente em relação ao mês anterior.

Fonte: Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S et al. 2001

3.7.7- HAQ (Health Assessment Questionnaire) ⁽²¹⁰⁾.

Quadro 7: HAQ (Health Assessment Questionnaire).

HAQ – Health Assessment Questionnaire				
Nível de dificuldade				
Você é capaz de:	Sem qualquer dificuldade	Com alguma dificuldade	Com muita dificuldade	Incapaz de fazer
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos?	0	1	2	3
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços?	0	1	2	3
4. Deitar-se e levantar-se da cama?	0	1	2	3
5. Cortar um pedaço de carne?	0	1	2	3
6. Levar à boca um copo ou uma xícara cheia de café, leite ou água?	0	1	2	3
7. Abrir um saco de leite comum?	0	1	2	3
8. Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9. Subir degraus?	0	1	2	3
10. Lavar e secar seu corpo após o banho?	0	1	2	3
11. Tomar banho de chuveiro?	0	1	2	3
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 Kg, que está posicionado pouco acima da cabeça?	0	1	2	3
14. Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô?	0	1	2	3
16. Abrir potes ou vidros de conservas, que tenham sido previamente abertos?	0	1	2	3
17. Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18. Fazer compras nas redondezas onde mora?	0	1	3	3
19. Entrar e sair de um ônibus?	0	1	3	3
20. Realizar tarefas tais como usar vassoura para varrer e rodo para tirar a água?	0	1	2	3

3.7.8- *sHAQ* (Scleroderma Health Assessment Questionnaire) ^(211, 212).

Quadro 8: *sHAQ* (Scleroderma Health Assessment Questionnaire)

Questionário sHAQ: 5 domínios adicionais (VAS):

ITEM	VAS (0 – 10)
Fenômeno de Raynaud	
Trato gastrintestinal	
Envolvimento pulmonar	
Dor	
Gravidade da doença	

Fonte: Johnson SR, Hawker GA, Davis AM. 2005

4. RESULTADOS

4.1- Dados demográficos e classificatórios

Analisou-se um total de 60 pacientes, sendo 59 mulheres (98,3%) e 1 homem (1,7%), com idade média de $51,18 \pm 1,56$ anos (média $\pm$ erro padrão da média).

Do total de pacientes, 30 pacientes referiam ser de cor branca (50,0%), 27 pacientes referiram a cor parda (45,0%) e 3 pacientes a cor negra (5,0%).

Com relação ao diagnóstico, 53 pacientes diagnosticados preenchiam os critérios do ACR⁽¹⁹⁹⁾ (88,3%). Dos 7 pacientes que não preenchiam estes critérios, 85,7% tinham a forma precoce da doença (Leroy/Medsger⁽²⁰¹⁾).

Com relação às formas clínicas da doença, 26 pacientes tinham a forma limitada (43,3%), 20 pacientes tinham a forma difusa (33,3%), 7 pacientes tinham a forma precoce (11,7%), 7 pacientes tinham a forma de sobreposição (*overlap*) (11,7%) e nenhum tinha a forma *sine scleroderma*.

Com relação ao tempo de diagnóstico, 16 pacientes foram diagnosticados há mais de 10 anos (26,7%), 28 pacientes foram diagnosticados entre 5 a 10 anos (46,7%) e 16 pacientes foram diagnosticados há menos de 5 anos (26,7%).

O tempo de evolução da doença dos pacientes em geral foi de $9,28 \pm 0,79$ anos.

As principais características dos pacientes encontram-se resumidos na Tabela 1:

Tabela 1: Distribuição dos pacientes de acordo com os dados demográficos e classificatórios (n=60).

Variável	% (n) ou média±EPM
Idade (anos)	51,18±1,56
Sexo	
Masculino	1,7 (1)
Feminino	98,3 (59)
Cor	
Branca	50,0 (30)
Parda	45,0 (27)
Negra	5,0 (3)
Amarela	0,0 (0)
Tempo de diagnóstico	
Menos de 5 anos	26,7 (16)
Entre 5 e 10 anos	46,7 (28)
Mais de 10 anos	26,7 (16)
Tempo de FRy antes da doença (anos)	3,72±0,88
Tempo de doença após o diagnóstico (anos)	9,28±0,79
Critérios ACR	
Sim	88,3 (53)
Não	11,7 (7)
Forma clínica	
Limitada	43,3 (26)
Difusa	33,3 (20)
Início recente	11,7 (7)
Sobreposição (<i>Overlap</i>)	11,7 (7)
<i>Sine scleroderma</i>	0,0 (0)

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta). FRy: Fenômeno de Raynaud, ACR: Colégio Americano de Reumatologia.

O tempo de evolução da doença na forma limitada foi de 10,04±1,09 anos e na forma difusa foi de 9,10±1,42 anos. Do total de pacientes, 39 (65,0%) já tinham fenômeno de Raynaud (FRy) antes do diagnóstico da doença e 21 (35,0%) pacientes apresentaram FRy

concomitantemente ao diagnóstico. Dos pacientes que tinham FRy antes do diagnóstico da doença, 53,8% evoluíram para a forma limitada após um tempo médio de 8,4 anos. Enquanto que neste grupo de pacientes com FRy prévio ao diagnóstico, 28,20% deles evoluíram para a forma difusa após um tempo médio de 2,8 anos.

Todos estes dados podem ser observados na Tabela 2:

Tabela 2: Análise comparativa das formas de apresentação clínica da ES sistêmica com dados demográficos e evolutivos da enfermidade (n=60).

Variável	Forma clínica		Valor de p
	Difusa	Limitada	
Idade (anos)	48,30±1,83	59,50±1,57	<0,001
Sexo			
Masculino	5,0 (1)	0,0 (0)	0,435
Feminino	95,0 (19)	100,0 (26)	
Cor			
Branca	45,0 (9)	57,7 (15)	0,571
Parda	45,0 (9)	38,5 (10)	
Negra	10,0 (2)	3,8 (1)	
Tempo de diagnóstico			
Mais de 10 anos	25,0 (5)	30,8 (8)	0,836
Entre 5 e 10 anos	55,0 (11)	46,2 (12)	
Menos de 5 anos	20,0 (4)	23,1 (6)	
Tempo de FRy antes do diagnóstico (anos)	1,55±0,54	6,04±1,83	0,025
Tempo de doença após o diagnóstico (anos)	9,10±1,42	10,04±1,09	0,596
Critérios ACR			
Sim	100,0 (20)	96,2 (25)	0,565
Não	0,0 (0)	3,8 (1)	

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta). * Valor de p no teste t-student, no teste exato de Fisher ou no teste do qui-quadrado. FRy: Fenômeno de Raynaud, ACR: Colégio Americano de Reumatologia.

4.2- Índices de monitoramento

O *sHAQ* na primeira avaliação (HAQ1) foi em média $0,63 \pm 0,05$, sendo o valor mais alto encontrado de 1,56 e o mais baixo foi 0. O *sHAQ* na segunda avaliação (HAQ2) realizada após 6 meses da primeira foi em média $0,63 \pm 0,05$, sendo o valor mais alto encontrado de 1,63 e o mais baixo foi 0.

O valor médio na escala de gravidade dos pacientes foi de $4,87 \pm 0,37$ e praticamente não houve diferença com relação a segunda avaliação. O valor mais alto encontrado em um paciente foi de 15 e o valor mais baixo foi de 1.

A escala de atividade na primeira avaliação (EA1) foi em média $2,30 \pm 0,17$, sendo o valor mais alto encontrado de 5,5 e o mais baixo foi 0. A escala de atividade na segunda avaliação (EA2) realizada após 6 meses da primeira foi em média $2,36 \pm 0,19$, sendo o valor mais alto encontrado de 6 e o mais baixo foi 0.

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 3:

Tabela 3: Escalas de *sHAQ*, de gravidade e de atividade dos pacientes com ES no intervalo de 6 meses.

Variável	% (n) ou média±EPM
Índices de monitoramento	
<i>sHAQ</i> 1	$0,63 \pm 0,05$
<i>sHAQ</i> 2	$0,63 \pm 0,05$
Escala de gravidade	$4,87 \pm 0,37$
Escala de atividade 1	$2,30 \pm 0,17$
Escala de atividade 2	$2,36 \pm 0,19$

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta). HAQ 1 foi obtido na primeira entrevista e o HAQ 2 foi obtido após 6 meses. Escala de atividade 1 foi obtida na primeira entrevista e a Escala de atividade 2 foi obtida após 6 meses. *sHAQ*: *scleroderma Health Assessment Questionnaire* (Questionário de Avaliação da Saúde em esclerose sistêmica).

4.3- Manifestações cutâneas

Do total de 60 pacientes, 10 deles tinham calcinose na avaliação (16,7%); destes, 70,0% tinham a forma limitada.

Na avaliação inicial, 13 pacientes não tinham alterações significativas nas mãos (21,7%). Entre os que apresentavam alterações nas mãos (78,3% - n=47), 14 pacientes apresentavam alterações compatíveis com a fase edematosa nas mãos (23,33%), 15 estavam na fase indurativa (31,9%) e 18 apresentavam fase atrófica (38,3%). Destes com a fase atrófica, 50,0% eram da forma difusa e outra metade da limitada.

O escore cutâneo de Rodnan (0-51) dos pacientes foi em média $13,08 \pm 1,06$. A média do escore de Rodnan dos pacientes com a forma difusa era de $17,50 \pm 2,04$ e da forma limitada era de $12,77 \pm 1,21$.

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 4:

Tabela 4: Manifestações cutâneas e escore de Rodnan nos pacientes com ES (n=60).

Variável	Forma clínica		Valor de p
	Difusa	Limitada	
Calcinose			
Sim	15,0 (3)	26,9 (7)	0,273
Não	85,0 (17)	73,1 (19)	
Mãos			
Sem alteração	15,0 (3)	15,4 (4)	1,000
Com alteração	85,0 (17)	84,6 (22)	
Achados nas mãos	(n=17)	(n=22)	
Fase edematosa	15,0 (3)	19,2 (5)	0,902
Fase indurativa	30,0 (6)	30,8 (8)	
Fase atrófica	40,0 (8)	34,6 (9)	
Escore cutâneo	17,50±2,04	12,77±1,21	0,042

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta). * Valor de p no teste t-student, no teste exato de Fisher ou no teste do qui-quadrado.

4.4- Manifestações vasculares

A totalidade dos pacientes (100,0%) do estudo tinham FRy, embora apenas 33,3% dos enfermos reportassem esta manifestação. Dos pacientes com FRy diagnosticados objetivamente durante o exame físico na consulta inicial, 17 tinham a forma difusa, 16 pacientes eram da forma limitada e 7 pacientes tinham ou a forma precoce ou a de sobreposição.

Na avaliação inicial, 14 pacientes tinham micro cicatrizes nas polpas digitais (23,3%). Destes com micro cicatrizes, 8 tinham a forma difusa (57,1%) e 4 tinham a forma limitada (28,6%).

Observou-se que 6 pacientes tinham úlceras digitais (UD) na entrevista inicial (10,0%). Destes com UD, 4 tinham a forma difusa (66,7%) e 2 tinham a forma limitada (33,3%).

Foi observado em 6 pacientes necrose ou amputação nas polpas digitais na avaliação inicial (10,0%). Destes com necrose, 3 tinham a forma difusa (50,0%) e 3 tinham a forma limitada (50,0%).

Do total de pacientes avaliados, 41 pacientes tinham telangiectasias na consulta inicial (68,3%). Destes, 24 pacientes tinham a forma limitada (58,5%) e 12 com a forma difusa (29,3%).

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 5:

Tabela 5: Frequência de manifestações vasculares em pacientes com ES (n=60).

Variável	% (n) ou média±EPM
Manifestações vasculares	
FRy	
Objetivo	66,7 (40)
Subjetivo	33,3 (20)
Ausente	0,0 (0)
Microcicatrices	
Sim	23,3 (14)
Não	76,7 (46)
Úlceras ativas	
Sim	10,0 (6)
Não	90,0 (54)
Necrose ou amputação	
Sim	10,0 (6)
Não	90,0 (54)
Telangiectasias	
Sim	68,3 (41)
Não	31,7 (19)

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta).

4.5- Manifestações musculoesqueléticas

Na avaliação inicial, 20 pacientes tinham artrite (33,3%). Destes pacientes, 9 tinham a forma limitada (45,0%), 6 tinham a forma difusa (30,0%) e 5 pacientes ou tinham a forma precoce ou a de sobreposição (25,0%).

Foi observado que 8 pacientes tinham contratura em flexão na avaliação inicial (13,3%). Destes pacientes, 5 tinham a forma difusa (62,5%), 2 tinham a forma limitada (25,0%) e 1 paciente tinha a forma de sobreposição (12,5%). Ademais, 2 pacientes tinham crepitação tendínea na avaliação inicial (3,3%). Sendo um paciente de cada forma da doença (difusa / limitada).

Com relação a fraqueza muscular, 8 pacientes apresentavam este sintoma na avaliação inicial (13,3%). Destes pacientes, 4 tinham a forma difusa (50,0%) e 2 tinham a forma limitada (25,0%). Ainda, 7 pacientes tinham atrofia muscular na avaliação inicial (11,7%). Destes pacientes, 5 tinham a forma difusa (71,4%) e 2 tinham a forma limitada (28,6%).

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 6:

Tabela 6: Frequência das manifestações musculoesqueléticas em pacientes com ES (n=60).

Variável	% (n) ou média±EPM
Manifestações musculoesqueléticas	
Artrite/sinovite	
Sim	33,3 (20)
Não	66,7 (40)
Contratura em flexão	
Sim	13,3 (8)
Não	86,7 (52)
Crepitação tendínea	
Sim	3,3 (2)
Não	96,7 (58)
Fraqueza muscular	
Sim	13,3 (8)
Não	86,7 (52)
Atrofia	
Sim	11,7 (7)
Não	88,3 (53)

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta).

4.6- Manifestações gastrintestinais

Do total de pacientes avaliados, 43 deles tinham sintomas de acometimento do esôfago na avaliação inicial (71,7%). Destes com queixas esofágicas, 46,5% tinham a forma limitada e 32,6% tinham a forma difusa.

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 7:

Tabela 7: Frequência de manifestações gastrointestinais em pacientes com ES (n=60).

Variável	% (n) ou média±EPM
Manifestações gastrintestinais	
Acometimento esôfago	
Sim	71,7 (43)
Não	28,3 (17)
Outros achados gastrintestinais	
DRGE	23,3 (14)
Esofagite	23,3 (14)
Gastrite	23,3 (14)
Hipotonia esofágica	15,0 (9)
Dilatação esôfago	5,0 (3)

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta). DRGE: Doença do Refluxo Gastro Esofágico.

As principais manifestações encontradas na endoscopia digestiva alta (EDA) destes pacientes sintomáticos foram: DRGE em 23,3% (n=14), Esofagite em 23,33% (n=14), Gastrite em 23,33% (n=14) e Hipotonia esofágica em 15,0% (n=9) destes pacientes.

As principais alterações observadas no exame de endoscopia digestiva alta dos pacientes encontram-se resumidos na Tabela 8:

Tabela 8: Frequência de alterações gastrointestinais em pacientes com ES, observadas no exame de endoscopia digestiva alta (n=60).

Manifestação gastrointestinal	% (n)
DRGE	23,3 (14)
Esofagite	23,3 (14)
Gastrite	23,3 (14)
Hipotonia esofágica	15,0 (9)
Dilatação do esôfago	5,0 (3)
Aperistalse	5,0 (3)
Discinesia esofágica	5,0 (3)
Discinesia gástrica	5,0 (3)
Hérnia de hiato	5,0 (3)
Duodenite	1,7 (1)
Telangiectasias	1,7 (1)
Úlcera gástrica	1,7 (1)

Nota: Cada paciente poderia apresentar mais de uma manifestação gastrointestinal. DRGE: Doença do Refluxo Gastro Esofágico.

4.7- Manifestações cardiopulmonares

Do total de pacientes avaliados, 35 destes (58,3%) tinham capacidade vital funcional pulmonar (CVF) normal na Espirometria (normal se $>80\%$). Os demais pacientes apresentavam alteração da capacidade vital pulmonar:

- 18 pacientes (30,0%) tinham redução da CVF leve (70 a 80% do previsto).
- 5 pacientes (8,3%) tinham redução da CVF moderada (50 a 69% do previsto).
- 2 pacientes (3,3%) tinham redução da CVF grave ($< 50\%$ do previsto).

Do total de 11,7% (n=7) dos pacientes com redução da CVF de forma moderada a grave, 4 tinham a forma difusa da doença (57,1%) e 3 tinham a forma limitada (42,9%).

Do total de pacientes com alterações na tomografia do tórax (45,0% - n=27), 19 destes tinham estabelecida fibrose pulmonar identificada na tomografia de alta resolução (70,4%) e 8 pacientes apresentavam padrão “vidro fosco” na avaliação inicial (29,6%). Dos pacientes com fibrose tomográfica, a maioria era da forma difusa (58,8%) e dos pacientes com padrão “vidro fosco”, a maioria era da forma limitada (50,0%).

Do total de pacientes avaliados com alterações no ecocardiograma (51,7% - n=31), 6 destes (19,4%) tinham hipertensão da artéria pulmonar (HAP) identificada no ecocardiograma transtorácico na avaliação inicial (valor da pressão estimada da artéria pulmonar superior a 35mmHg). Dos pacientes com HAP identificada, a maioria dos pacientes eram da forma limitada (85,7%).

O resumo das manifestações cardiopulmonares pode ser observado na Tabela 9:

Tabela 9: Frequência de alterações cardiopulmonares em pacientes com ES (n=60).

Variável	% (n) ou média±EPM
Manifestações cardiopulmonares	
CVF	82,72±1,75
CVF - classificação	
>80%	58,3 (35)
Entre 70 e 80%	30,0 (18)
Entre 50 e 69%	8,3 (5)
<50%	3,3 (2)
Tomografia do tórax	
Normal	55,0 (33)
Alterado	45,0 (27)
Achados na tomografia (n=27)	
Fibrose	70,4 (19)
Padrão “vidro fosco”	29,6 (8)
Eco PSAP	32,83±3,42
Resultado do ecocardiograma	
Normal	48,3 (29)
Alterado	51,7 (31)
Achados no ecocardiograma (n=31)	
Valvulopatia	51,6 (16)
HVE concêntrica	32,3 (10)
Disfunção diastólica VE	25,8 (8)
HAP leve ou moderada	19,4 (6)
Pericardite	16,1 (5)

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta). CVF: capacidade vital funcional pulmonar, PSAP: pressão estimada na artéria pulmonar, HAP: hipertensão da artéria pulmonar.

Todos os pacientes já haviam sido submetidos pelo menos a uma avaliação ecocardiográfica prévia e 31 pacientes apresentaram alterações (51,7%). As principais manifestações encontradas no ecocardiograma dos pacientes foram: valvulopatia em 16

pacientes (51,6%), hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo (HVE) em 10 pacientes (32,3%), disfunção diastólica do ventrículo esquerdo em 8 pacientes (25,8%), hipertensão da artéria pulmonar (HAP) em 6 pacientes (19,4%) e pericardite em 5 pacientes (16,1%). Sendo que 13 dos 31 pacientes com alterações no ecocardiograma tinham mais que uma alteração concomitante no exame.

As principais alterações observadas no exame de ecocardiograma transtorácico dos pacientes encontram-se resumidos na Tabela 10:

Tabela 10: Frequência de alterações ecocardiográficas em pacientes com ES (n=60).

Variável	% (n)
Ecocardiograma	
Normal	48,3 (29)
Alterado	51,7 (31)
Manifestação cardiovascular (n=31)	
Valvulopatia	51,6 (16)
HVE concêntrica	32,3 (10)
Disfunção diastólica VE	25,8 (8)
Pericardite	16,1 (5)
HAP leve	9,7 (3)
HAP moderada	9,7 (3)
Arritmia	3,2 (1)
Dilatação aorta ascendente	3,2 (1)
Uso de Marcapasso	3,2 (1)

Nota: Cada paciente poderia apresentar mais de uma manifestação cardiovascular. HVE: hipertrofia do ventrículo esquerdo, VE: ventrículo esquerdo, HAP: hipertensão da artéria pulmonar.

4.8- Manifestações renais

Apenas 1 paciente da forma limitada apresentou crise renal esclerodérmica, com elevação da creatinina plasmática até 2,8mg/dl e necessitou diálise transitória para sua recuperação (1,7%). Esta paciente apresentava anticorpo anti colágeno V positivo na avaliação inicial.

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 11:

Tabela 11: Frequência de envolvimento renal grave em pacientes com ES (n=60).

Variável	% (n) ou média±EPM
Manifestações renais	
Crise renal esclerodérmica	
Sim	1,7 (1)
Não	98,3 (59)
Diálise	
Não	98,3 (59)
Sim (temporária)	1,7 (1)

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta).

4.9- Antecedentes pessoais

Dentre os pacientes estudados, 12 se declararam ex tabagistas (20,0%), sendo que a carga tabágica (tempo de fumo) média foi de 20,58 anos de tabagismo neste grupo. Além disso, 2 pacientes são tabagistas ativos (3,3%), com tempo médio de uso de 20,0 anos.

Do total de pacientes avaliados, 9 destes (15,0%) tinham diabetes identificado na avaliação inicial. Todos os pacientes com diabetes não estavam fazendo uso de corticóides na avaliação inicial e a maioria dos pacientes com diabetes eram da forma limitada (55,6%).

Apenas 1 paciente da forma limitada apresentava câncer (colo uterino) na avaliação inicial (1,7%), a mesma foi submetida a ressecção cirúrgica e se encontra em observação clínica.

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 12:

Tabela 12: Distribuição dos pacientes de acordo com os antecedentes pessoais (n=60).

Variável	% (n) ou média±EPM
Antecedentes pessoais	
Tabagismo	
Sim	3,3 (2)
Não	76,7 (46)
Ex-Tabagista	20,0 (12)
	20,78±1,2
Anos de tabagismo	5
Diabetes	
Sim	15,0 (9)
Não	85,0 (51)
Neoplasia	
Sim	1,7 (1)
Não	98,3 (59)

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta).

4.10- Exames laboratoriais

Do total de pacientes avaliados, 25 destes (41,7%) apresentavam elevação de provas inflamatórias (velocidade de hemossedimentação > 30mm na primeira hora e/ou proteína C reativa > 6mg/dl) na consulta clínica inicial. Destes, 11 tinham a forma limitada (44,0%), 9 eram da forma difusa (36,0%) e os outros 5 pacientes eram ou da forma precoce ou da sobreposição.

Dos 60 pacientes avaliados, 9 destes (15,0%) apresentavam elevação de creatinofosfoquinase (CPK) na consulta inicial. Destes, 3 tinham diagnóstico de sobreposição com miopatia inflamatória (33,3%).

Apenas a paciente da crise renal esclerodérmica tinha elevação da creatinina (valor normal entre 0,6 a 1,3 mg/dl).

Apenas 2 pacientes apresentavam queda dos complementos séricos C3 e C4 (3,3%), sendo 1 paciente de cada forma da doença (difusa / limitada).

Do total de pacientes avaliados, 7 destes (11,7%) apresentavam anti Ro (SSA) positivo. Todos os pacientes com anti Ro (SSA) positivo tinham síndrome de Sjögren associada e destes, 5 pacientes tinham a forma difusa (71,4%) e 2 pacientes com a forma limitada (28,6%).

Apenas 1 paciente da forma difusa apresentava anti La (SSB) positivo (1,7%) e apenas 1 paciente de sobreposição com LES apresentava anti Sm positivo (1,7%).

Do total de pacientes avaliados, 10 destes (16,7%) apresentavam anti RNP positivo. Destes, 6 tinham sobreposição com outras doenças do colágeno (60,0%), 2 pacientes eram da forma difusa (20,0%), os outros pacientes eram da forma limitada (10% - n=1) e da forma precoce (10% - n=1).

Apenas 2 pacientes apresentavam anti-Jo1 positivo (3,3%). Sendo um paciente de cada forma da doença (difusa / limitada).

A radiografia (Rx) das mãos foi normal em 34 pacientes (56,7%). Entre os 26 pacientes com Rx alterado observou-se reabsorção de falange distal em 17 deles (65,4%), sendo 8 pacientes da forma difusa (47,1%), 8 pacientes da forma limitada (47,1%) e 1 paciente com sobreposição. Observou-se ainda calcinose em 9 pacientes (34,6%), principalmente da forma limitada (77,8%).

Os resultados encontram-se resumidos nas Tabelas 13 e 14:

Tabela 13: Distribuição dos pacientes de acordo com os resultados de exames laboratoriais.

Variável	média±EPM
Exames laboratoriais	
VHS	27,50±2,76
PCR	11,24±2,63
CPK	126,75±13,2 4
Cr	0,75±0,03
C3	130,87±3,41
C4	33,43±1,25

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média.

Tabela 14: Distribuição dos pacientes avaliados de acordo com os resultados de autoanticorpos e radiografia das mãos (n=60).

Variável	n (%)
Exames laboratoriais	
Anti Ro (SSA)	
Positivo	7 (11,7)
Negativo	53 (88,3)
Anti La (SSB)	
Positivo	1 (1,7)
Negativo	59 (98,3)
Anti Sm	
Positivo	1 (1,7)
Negativo	59 (98,3)
Anti RNP	
Positivo	10 (16,7)
Negativo	50 (83,3)
Anti Jo 1	
Positivo	2 (3,3)
Negativo	58 (96,7)
RX mãos	
Normal	34 (56,7)
Alterado	26 (43,3)
Achados no RX de mãos (n=26)	
Calcinose	9 (34,6)
Reabsorção falange distal	17 (65,4)

Nota: Os resultados estão apresentados em frequência absoluta (frequência relativa).

4.11 Anticorpo antinuclear, anticorpo anti colágeno V e anticorpos específicos de ES

O anticorpo antinuclear (AAN) foi positivo em 57 pacientes (95%) e os 3 pacientes com AAN negativo tinham a forma precoce da doença. Os padrões de AAN mais encontrados nos pacientes foram: nuclear centromérico com placa metafásica (PM) positiva em 20 pacientes (33,33%), nuclear pontilhado fino com PM negativa em 13 pacientes (21,67%) e nuclear quase homogêneo com PM corando 5 a 10 pontos em 11 pacientes (18,33%). Encontram-se resumidos os principais padrões do anticorpo antinuclear na Tabela 15:

Tabela 15: Distribuição dos pacientes de acordo com a positividade do anticorpo antinuclear (n=60).

Variável	n (%)
Anticorpo antinuclear (AAN)	
Positivo	57 (95,0)
Negativo	3 (5,0)
AAN positivo (n=57)	
Nuclear centromérico com placa metafásica +	20 (35,1)
Nuclear pontilhado fino com placa metafásica -	13 (22,8)
Nuclear quase homogêneo com placa metafásica corando 5 a 10 pontos	11 (19,3)
Outros	13 (22,8)

Nota: Os resultados estão apresentados em frequência absoluta (frequência relativa).

Dos 60 pacientes avaliados, apenas 2 (3,3%) apresentaram anti COL V positivo na avaliação inicial, ambos da forma difusa. Na segunda avaliação, quando todos os pacientes refizeram o anti COL V após 6 meses, apenas 3 pacientes (5,0%) apresentaram positividade para o anti COL V, sendo 2 pacientes da forma limitada e 1 paciente da forma difusa. O total de pacientes com anti COL V positivo foi de 8,3%, sendo os 2 pacientes com positividade

para anti COL V na avaliação inicial diferentes dos 3 pacientes com anticorpo positivo na segunda avaliação.

A positividade do anti COL V se correlacionou com a atividade clínica dos pacientes com ES, de acordo com os critérios de atividade de Valentini (Tabela 16 e Gráfico 1). Ademais observou-se significância estatística entre a positividade do anticorpo e a crise renal esclerodérmica, além de haver tendência estatística entre a presença do mesmo anticorpo (anti COL V) e a manifestação clínica de hipertensão pulmonar, como pode ser observado na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados referentes aos índices de monitoramento em pacientes com anti colágeno V positivo ou negativo.

Variável	Anti colágeno V		Valor de p*
	Negativo (n=55)	Positivo (n=5)	
<i>sHAQ</i>	0,63±0,05	0,81±0,21	0,330
Escala de gravidade	4,73±0,39	6,40±1,25	0,220
Escala de atividade	2,25±0,18	3,80±0,52	0,016 •
Tempo de doença (anos)	8,55±0,85	5,40±1,12	0,274
Valor da PSAP (mmHg)	31,50±3,98	39,50±2,50	0,409
Hipertensão artéria pulmonar			
Sim	4 (6,7)	2 (3,3)	0,074
Não	51 (85,0)	3 (5,0)	
Crise renal esclerodérmica			
Sim	0 (0,0)	1 (20,0)	0,001 •
Não	55 (100,0)	4 (80,0)	

Nota: Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média ou em frequência absoluta (frequência relativa). * Valor de p no teste t-student ou no teste do qui-quadrado. • Valor significativo de p. HAQ: Questionário de Avaliação da Saúde, PSAP: pressão estimada na artéria pulmonar.

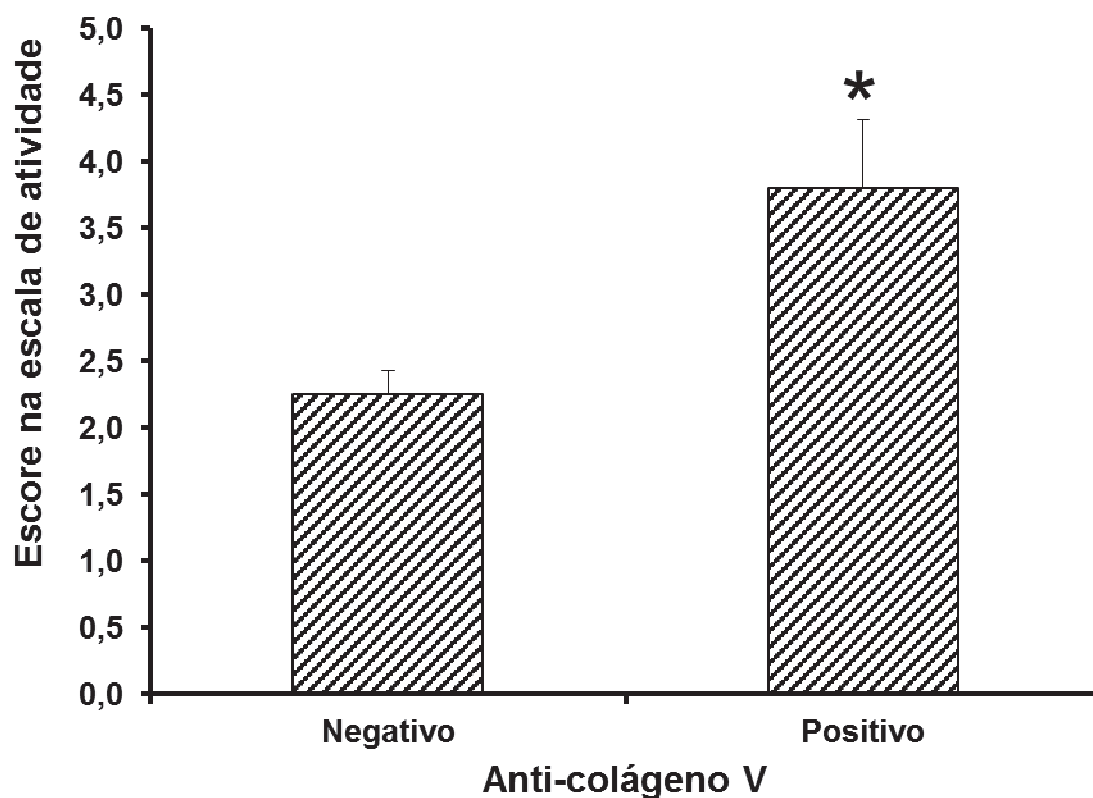


Gráfico 1: Escore na escala de atividade da doença, em pacientes com resultado negativo ou positivo para anti colágeno V. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média. * Diferença significativa em relação aos pacientes com anti colágeno V negativo (teste t-student, $p=0,016$).

Houve correlação linear positiva significativa entre o *HAQ* e a atividade da doença (teste de correlação linear de Pearson, $p<0,001$, $r=0,600$, $r^2=0,360$), como pode ser demonstrado no Gráfico 2:

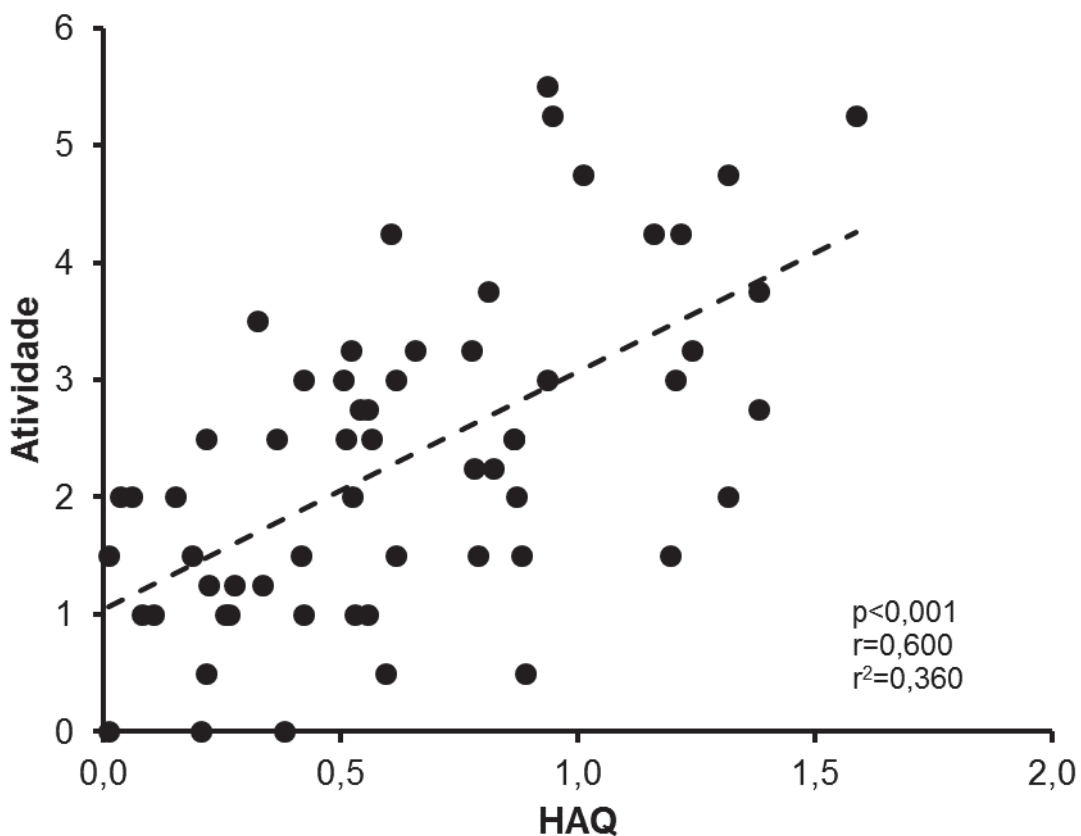


Gráfico 2: Dispersão ilustrando a correlação linear entre o *HAQ* e a atividade da doença. Cada símbolo representa o valor de *HAQ* e atividade para um único paciente. A linha pontilhada representa a linha de regressão linear.

Do total de pacientes avaliados, 16 destes (26,7%) apresentavam anti topoisomerase I positivo. Sendo que 12 destes pacientes tinham a forma difusa (75,0%).

Do total de pacientes avaliados, 25 destes (41,7%) apresentavam anti centrômero positivo. Entre estes pacientes, 21 tinham a forma limitada (84,0%) e os outros tinham a forma precoce.

Do total de pacientes avaliados, 7 destes (11,7%) apresentavam anti RNA polimerase III positivo. Sendo que 3 destes pacientes tinham a forma difusa (42,9%).

Nenhum dos pacientes avaliados apresentava anti Pm/Scl positivo.

Conjuntamente, não se observou associação estatisticamente significativa entre a positividade do anti COLV e os demais anticorpos específicos para ES, resumidos na Tabela 17:

Tabela 17: Associação entre a pesquisa para o anticorpo anti COL V e o resultado para os anticorpos anticentrômero, anti Scl70 e anti POL 3 (n=60).

Anticorpo	Anti COL V		Valor de p*
	Negativo (n=55)	Positivo (n=5)	
Anticentrômero			
Negativo	31 (56,4)	4 (80,0)	0,299
Positivo	24 (43,6)	1 (20,0)	
Anti Scl70			
Negativo	41 (74,5)	3 (60,0)	0,403
Positivo	14 (25,5)	2 (40,0)	
Anti POL 3			
Negativo	49 (89,1)	4 (80,0)	0,475
Positivo	6 (10,9)	1 (20,0)	

Nota: Os resultados estão apresentados em frequência absoluta (frequência relativa). * Valor de p no teste exato de Fisher. COL V: colágeno tipo V, anti Scl70: anti DNA topoisomerase I, anti POL 3: anti RNA polimerase III.

4.12- Medicamentos em uso

Do total de pacientes avaliados, 14 destes (23,3%) faziam uso de corticóides na avaliação inicial, sendo que metade destes pacientes apresentava manifestação de fase edematosa nas mãos.

O total de pacientes que fazia uso de bloqueadores dos canais de cálcio na avaliação inicial foi de 51,7%, sendo que 11 pacientes faziam uso de nifedipina (18,3%), 14 pacientes faziam uso de anlodipina (23,3%) e 6 pacientes faziam uso de diltiazem (10,0%).

O total de pacientes que fazia uso de medicações redutoras de angiotensina II na avaliação inicial foi de 26,7%, sendo que 8 pacientes faziam uso de losartana (13,3%) e 8 pacientes faziam uso de captopril (13,3%).

Nenhum paciente fazia uso de sildenafila na avaliação inicial e 3 pacientes faziam uso de bosentana (5,0%), 2 pacientes por úlceras digitais recidivantes e 1 paciente por HAP.

Do total de pacientes avaliados, 27 destes (45,0%) faziam uso de ácido acetil salicílico (AAS).

O total de pacientes que fazia uso de medicações com propriedades vasodilatadoras na avaliação inicial foi de 88,3%, sendo que 42 pacientes faziam uso de cilostazol (70,0%) e 11 pacientes faziam uso de pentoxifilina (18,3%).

Do total de pacientes avaliados, 36 destes (60,0%) faziam uso de azatioprina. E com relação ao uso de outros imunossupressores, 28 pacientes estavam em uso atual ou fizeram uso prévio de ciclofosfamida (46,7%).

Do total de pacientes avaliados, 50 destes (83,3%) faziam uso de inibidores de bomba de prótons. E com relação ao uso de outros gastroprotetores, 37 pacientes (61,67%) estavam em uso atual de procinéticos (bromoprida ou domperidona).

As outras medicações mais frequentemente utilizadas pelos pacientes foram: metotrexate em 11 pacientes (18,3%), cloroquina em 9 pacientes (15,0%), bifosfonados em 5 pacientes (8,3%) e clopidogrel em 4 pacientes (6,7%).

Encontram-se resumidos os principais medicamentos utilizados pelos pacientes na Tabela 18:

Tabela 18: Distribuição dos pacientes de acordo com o uso de medicamentos (n=60).

Medicamento	n (%)
Inibidor de bomba de prótons	50 (83,3)
Cilostazol	42 (70,0)
Procinéticos	37 (61,7)
Azatioprina	36 (60,0)
Ciclofosfamida	28 (46,7)
AAS	27 (45,0)
Methotrexate	16 (26,7)
Anlodipina	14 (23,3)
Corticóides	14 (23,3)
Nifedipina	11 (18,3)
Pentoxifilina	11 (18,3)
Captopril	8 (13,3)
Losartana	8 (13,3)
Alendronato	6 (10,0)
Diltiazem	6 (10,0)
Bosentana	3 (5,0)
Sildenafil	0 (0,0)

Nota: Cada paciente poderia estar utilizando mais de uma medicação concomitantemente.

4.13- Grupo controle

Foram coletados soros de 26 pacientes doadores de sangue saudáveis, sendo 21 mulheres (80,8%) e 5 homens (19,2%), com idade média de $40,34 \pm 0,73$ anos (média $\pm$ erro padrão da média). Os anticorpos antinucleares, anti COLV, anticentrômero e anti DNA topoisomerase I foram negativos em todos os pacientes do grupo controle.

4.14- Principais observações com significância estatística

- 4.14.1 Houve correlação linear positiva significativa, entre o *sHAQ* e a atividade da doença (teste de correlação linear de Pearson, $p<0,001$, $r=0,600$, $r^2=0,360$).
- 4.14.2 O escore na escala de atividade entre os pacientes com anti colágeno V positivo ($3,80\pm0,52$) foi significativamente maior do que aquele para os pacientes com anti colágeno V negativo ($2,25\pm0,18$) (teste t-student, $p=0,016$).
- 4.14.3 A idade dos pacientes com a doença na forma limitada ($59,50\pm1,57$ anos) foi significativamente maior do que aquela para os pacientes com a forma da doença difusa ($48,30\pm1,83$ anos) (teste t-student, $p<0,001$).
- 4.14.4 O tempo de FRY entre os pacientes com a doença na forma limitada ($6,04\pm1,83$ anos) foi significativamente maior do que aquele para os pacientes com a forma da doença difusa ($1,55\pm0,54$ anos) (teste t-student, $p=0,025$).
- 4.14.5 O escore cutâneo entre os pacientes com a doença na forma difusa ($17,50\pm2,04$) foi significativamente maior do que aquele para os pacientes com a forma da doença limitada ($12,77\pm1,21$) (teste t-student, $p=0,042$).
- 4.14.6 O percentual de pacientes da forma limitada da doença que apresentavam telangectasias (92,3% - $n=24$) foi significativamente maior do que o daqueles com a doença difusa, que também apresentavam telangectasias (60,0% - $n=12$) (teste exato de Fisher, $p=0,011$).
- 4.14.7 A PSAP de 26 pacientes com a forma limitada da doença ($38,13\pm2,57$ mmHg) foi significativamente maior do que aquela para os 20 pacientes com a forma difusa ($22,25\pm6,45$ mmHg) (teste t-student, $p=0,019$).
- 4.14.8 O percentual de pacientes da forma difusa da doença que apresentavam o anticorpo anti Ro positivo (25,0% - $n=5$) foi significativamente maior do que o daqueles com a doença limitada, que também apresentavam o anticorpo anti Ro positivo (0,0% - $n=0$) (teste exato de Fisher, $p=0,011$).
- 4.14.9 O percentual de pacientes da forma difusa da doença que apresentavam o anticorpo anti Scl70 positivo (65,0% - $n=13$) foi significativamente maior do que o daqueles com a doença limitada, que também apresentavam o anticorpo anti Scl70 positivo (3,8% - $n=1$) (teste exato de Fisher, $p<0,001$).
- 4.14.10 O percentual de pacientes da forma limitada da doença que apresentavam o anticorpo anticentrômero positivo (80,8% - $n=21$) foi

significativamente maior do que o daqueles com a doença difusa, que também apresentavam o anticorpo anticentrômero positivo (0,0% - n=0) (teste exato de Fisher, $p=0,001$).

5. DISCUSSÃO

Definiu-se neste trabalho uma amostra representativa do Centro-Oeste do Brasil, caracterizada por um grupo heterogêneo de 60 pacientes, com vários espectros da doença e diferentes estágios de manifestações clínicas e atividade da doença, mas que é muito semelhante a outras populações de pacientes do país e mesmo de outras localidades ^(120, 219, 220, 221, 222, 223).

No que concerne aos critérios diagnósticos, quase 90% dos pacientes avaliados nesta pesquisa preenchiam os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1980 que, apesar de altamente sensíveis (97%) e específicos (98%) para o diagnóstico de ES ⁽¹⁹⁹⁾, não são capazes de detectar precocemente a doença. Posto isso, os demais pacientes que não preenchiam os critérios do ACR, foram classificados com a forma precoce da doença, através dos critérios de LeRoy e Medsger ⁽²⁰¹⁾ e mais recentemente, verificou-se a homogeneidade da população avaliada, já que todos os pacientes do trabalho preencheram os novos critérios de classificação para ES de 2013 ⁽²⁰⁰⁾.

5.1 – Características demográficas dos pacientes com ES

No Brasil como em todas as regiões do mundo, ocorreram algumas diferenças na taxa de mulheres acometidas pela doença em relação aos homens, havendo uma predominância feminina em todos os estudos ^(6, 120, 219, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236). Houve concordância do nosso estudo com a Literatura. Tem sido sugerido a participação dos estrógenos na patogenia da ES ⁽⁶⁾, que poderia explicar pelo menos em parte, a maior frequência da enfermidade em mulheres, principalmente durante o período fértil feminino ⁽⁹⁹⁾. Contudo, a razão feminina/masculina encontrada aqui de 59:1 foi muito superior a qualquer região pesquisada. Por exemplo, dados nacionais encontraram uma taxa variável de 7,7:1 a 32:1 mulheres para cada homem acometido ^(120, 219, 222, 223, 236), na América do Sul (Argentina) taxa de 17:1 ⁽²²⁴⁾, no Caribe (Porto Rico e Barbados) taxas respectivamente de 23:1 ⁽²²⁵⁾ e 26:1 ⁽²²⁶⁾, na América do Norte (EUA e Canadá) taxas respectivamente de 6,1:1 ⁽¹⁹⁷⁾ e 7,6:1 ⁽²²⁹⁾, na Ásia (Taiwan e Japão) taxas respectivamente de 3,5:1 ⁽²³⁰⁾ e 14:1 ⁽²³¹⁾, Oriente Médio (Iraque) taxa de 8,3:1 ⁽²³²⁾ e na Europa (Itália, Alemanha, França e Inglaterra)

taxas respectivamente de 9,7:1 ⁽²³³⁾, 5:1 ⁽²²⁰⁾, 11,5:1 ⁽²³⁴⁾ e 5,2:1 ⁽¹⁹⁸⁾. Tal viés provavelmente ocorreu porque outros 3 pacientes masculinos com ES do Serviço não participaram da presente pesquisa. Ademais, outro fator que poderia explicar esta taxa discordante seria o pior prognóstico e sobrevida observado em homens em diversos estudos ^(221, 228), interessante esta diferença tornou-se aparente precocemente no curso da doença ⁽²²⁸⁾. Estudo com 1012 pacientes italianos portadores de ES encontrou uma taxa mulher/homem na primeira visita (7,8:1) diferente da observada após 10 anos de seguimento (10,4:1), em decorrência da taxa de mortalidade masculina ser 34% maior que a feminina ⁽²²¹⁾.

Com relação aos outros dados demográficos encontrados, a idade média destes pacientes foi quase consenso entre os diversos trabalhos no Brasil e no mundo ^(6, 120, 198, 219, 220, 221, 222, 223, 228, 229, 231, 233, 234, 236), ocorrendo o diagnóstico entre 40 e 50 anos de idade; somente a população afro-caribenha ⁽²²⁶⁾ apresentou uma média de idade mais precoce ao diagnóstico (37,3 anos). Ainda houve concordância entre vários estudos na observação de que o fenômeno de Raynaud (FRy) foi identificado precocemente, muitas vezes muitos anos antes do diagnóstico definitivo ^(198, 220, 221, 223, 227, 231, 237), principalmente na forma limitada. Relata-se ainda que uma menor duração do FRy até o início da doença foi significativamente correlacionada com pior sobrevida ⁽²²¹⁾, bem como o início do FRy em uma idade mais tardia ⁽²²⁷⁾. Do mesmo modo, o tempo de evolução da doença foi maior na forma limitada do que na difusa, como observado na literatura ^(6, 120, 219, 220, 221, 227, 228), possivelmente devido à maior taxa de gravidade e mortalidade verificadas no segundo grupo.

No que se refere a cor referida pelos próprios pacientes, houve predominância quase equivalente entre a branca e parda, no entanto, não se descarta a possibilidade de ocorrência de vieses de classificação racial, devido alto grau de miscigenação encontrado na população brasileira ⁽²¹⁹⁾. Na região Sul ⁽¹²⁰⁾ e Sudeste ⁽²²²⁾ do país encontrou-se uma maior prevalência de brancos, em contrapartida observou-se na região Nordeste ⁽²³⁶⁾ uma grande prevalência de mulatos e negros, provavelmente devido o estudo ter sido realizado em um Estado sabidamente com predomínio de afrodescendentes (Bahia). Revisão sistemática reportou diversos estudos que sugerem que indivíduos negros têm maior taxa de incidência e doença mais grave do que os brancos ⁽²³⁸⁾. Dados de prevalência da ES em um distrito francês multiétnico sugeriu que a doença parece ser mais frequente e grave em uma população de origem não-europeia, sustentando a ideia de que a raça poderia influenciar a susceptibilidade ao desenvolvimento da ES e seu perfil clínico ⁽²³⁴⁾. Outro relato prévio notou uma associação entre raça/etnia e as manifestações na ES, bem como a presença de certos autoanticorpos ⁽²³⁵⁾.

O grupo europeu de pesquisa na ES igualmente destacou que variações geográficas dos pacientes portadores de ES podem também influenciar no que diz respeito a associações de anticorpos e na taxa de ocorrência entre mulheres e homens, mas não encontrou associações entre raças⁽²³⁹⁾. Neste estudo, a maioria dos pacientes nasceu no próprio estado (70,58%), sendo que os demais eram naturais de diversas localidades, mas principalmente pacientes naturais do estado de São Paulo (13,44%) e do Paraná (5,04%). No entanto, todos os pacientes eram procedentes do estado de Mato Grosso do Sul, principalmente da cidade de Campo Grande (73,11%), seguido por pacientes de Dourados (2,52%) e de Nova Andradina (2,52%), entre outras.

Neste estudo, a forma clínica limitada da doença apresentou leve predomínio sobre a forma difusa, em concordância com outras descrições no país^(120, 219, 222, 223, 236) e na grande maioria de outras populações^(198, 220, 221, 228, 229, 233, 234). Contudo, existem descrições de que a forma difusa é mais frequente em populações de raça negra quando comparados com caucasianas^(228, 234, 235), incluindo-se neste caso, os descendentes afro-caribenhos onde foi observado predomínio da forma difusa (63%) sobre a limitada (37%)⁽²²⁶⁾. Ademais, é bem conhecida a predominância da forma difusa sobre a limitada em outros grupos étnicos, como o exemplo da população de índios nativos americanos da etnia Choctaw, onde 92% dos acometidos tem ES difusa e 83% destes apresentam anticorpos anti-topoisomerase I^(6, 228, 234). Observou-se neste estudo uma maior proporção de indivíduos pardos e negros com a forma difusa da doença (n=20 – 55%) em relação à forma limitada (n=26 – 42%), embora sem significância estatística. Da mesma maneira, ao levarmos em conta apenas estudos de mortalidade, verificamos que os pacientes com evolução fatal são, usualmente, da forma difusa^(6, 221, 227) e inclusive apresentam duração média da doença menor do que aqueles com a forma limitada (7,1 anos *versus* 15 anos)⁽²²⁷⁾. No presente trabalho, os pacientes com a forma difusa da doença apresentavam mais gravidade (6,1 *versus* 4,9) e atividade de doença (2,8 *versus* 2,2) em comparação com aqueles com a forma limitada, porém sem atingir significância estatística.

5.2 – Manifestações clínicas dos pacientes com ES

Em relação às manifestações cutâneas dos pacientes, observou-se que o escore de Rodnan modificado (ERM) foi significativamente maior entre os pacientes esclerodérmicos

com a forma difusa ($17,50 \pm 2,04$) do que aquele observado nos pacientes com a forma limitada ($12,77 \pm 1,21$), como já era esperado e os índices foram comparáveis a outras populações^(20, 119, 235), incluindo brasileiras^(219, 223). Por exemplo, neste estudo os pacientes de cor branca da forma difusa apresentavam ERM muito superior aos pacientes da mesma cor com a forma limitada ($19,1$ *versus* $12,4$). O ERM desempenha um papel fundamental na avaliação da atividade da doença⁽²⁴⁰⁾ além de valor preditivo positivo com a taxa de mortalidade^(202, 222). Inclusive relata-se que a melhora do endurecimento cutâneo superior a 25% esteve relacionado com maior sobrevivência⁽²⁰²⁾. O aumento no escore cutâneo também já foi associado com piora no índice HAQ⁽²⁴¹⁾ e observou-se uma correlação inversa entre o ERM e a capacidade vital pulmonar, idade e clearance de creatinina⁽²⁴²⁾. Curiosamente, estudo americano com 263 pacientes de Nietert e cols encontraram um ERM diferente e estatisticamente significativo entre duas raças, sendo mais elevado na negra do que na branca ($16,9 \pm 1,32$ *versus* $13,3 \pm 0,8$)⁽²³⁵⁾. Em concordância, encontrou-se neste trabalho que os pacientes com maior escore cutâneo foram da cor negra com a forma difusa, contudo surpreendentemente tal escore foi muito mais elevado do que o observado por Nietert e cols⁽²³⁵⁾ (ERM = 31,5).

Observou-se neste estudo que quase metade dos pacientes apresentavam alterações radiográficas nas mãos (43,3%), representados pela reabsorção das falanges distais em 17 pacientes, calcinose nas radiografias realizadas em 9 pacientes e redução do espaço articular com erosões subcondrais em 4 pacientes. Observou-se que os pacientes com calcinose eram predominantemente da forma limitada (77,8%), já os pacientes com reabsorção das falanges distais estavam distribuídos de forma equitativa entre as formas limitada e difusa. Estudo de achados cutâneos em 32 pacientes portadores de ES na região Sul do país encontrou alta prevalência de envolvimento das mãos na forma indurativa e calcinose em 12,5% dos pacientes⁽²²³⁾. Já foi descrita uma associação medida entre o índice de qualidade de vida e o déficit funcional ocasionado pelo comprometimento das mãos⁽²³⁷⁾. Ademais, descreve-se que a incapacidade causada pelo envolvimento das mãos nos pacientes com ES foi tão importante quanto a observada em uma população de pacientes com AR com duração da doença de 10 anos⁽²¹²⁾.

A manifestação clínica mais comumente observada nos pacientes com ES avaliados foi relacionada ao envolvimento vascular, representado pelo fenômeno de Raynaud (FRy) em todos os pacientes e telangiectasias em mais de dois terços dos mesmos. Outro estudo nacional de prevalência de manifestações cutâneas na ES também encontrou FRy em

100% dos pacientes, no entanto a prevalência de telangiectasias foi menor (43,7%)⁽²²³⁾. O FRy é a manifestação clínica mais precoce da ES e pode preceder o aparecimento de fibrose em meses a anos^(37, 223). A duração do FRy foi um fator independente relacionado com a gravidade de desvascularização observada na capilaroscopia periungueal, e as áreas avasculares se associaram com a atividade da doença pulmonar em ES⁽²⁴³⁾. A alta prevalência de telangiectasias neste estudo, embora tenha ocorrido principalmente na forma limitada (58,5%), também foi vista nos outros grupos de pacientes. Tal fato pode ser explicado pela observação clássica de Medsger, que descreveu que os pacientes com a forma cutâneo difusa tardia da ES (mais de 10 anos de evolução) apresentam desenvolvimento de telangiectasias e calcinose, podendo ocorrer erros diagnósticos com a forma limitada⁽²⁰³⁾.

As manifestações musculoesqueléticas não foram muito prevalentes neste estudo, representados por 20 pacientes com artrite (33,3%), 8 pacientes com contratura em flexão (13,3%) e 8 pacientes com fraqueza muscular (13,3%). No entanto, os sintomas contribuíram em muito com o déficit funcional e baixa qualidade de vida apresentados pelos pacientes (Questionário de Avaliação de Saúde - HAQ), sendo representadas sobretudo por artrite em um terço dos pacientes. Outros estudos no Brasil encontraram maior prevalência de manifestações osteoarticulares (47,7%)⁽²²²⁾, com artralgia variando entre 80,9%⁽²¹⁹⁾ a 84,5%⁽²³⁶⁾, além de artrite descrita em 44,4% dos pacientes⁽²¹⁹⁾. Recentemente, Schmeiser e cols encontraram a ocorrência de 31% de artrite em uma coorte similar com 58 pacientes⁽²⁴⁴⁾. Observou-se neste trabalho, que 3 pacientes (5%) apresentavam sobreposição verdadeira com AR, incluindo anti CCP positivo e manifestações radiográficas. Na literatura a prevalência de sobreposição verdadeira com AR é descrita entre 4,3 a 5,2% nos pacientes com ES e sugere-se que o *overlap* seja uma síndrome distinta, por apresentar características genéticas próprias⁽²⁴⁵⁾. Em população com 719 pacientes com ES, a AR foi a segunda doença concomitante mais prevalente em um estudo de poliautoimunidade (21%) e a mais comumente observada na autoimunidade familiar (18%)⁽²²⁾.

Por outro lado, os sintomas de acometimento esofágico foram comumente relatados (71,1%) pelos pacientes do estudo, sendo prevalentes em ambas as formas da doença. Nos pacientes sintomáticos, que foram submetidos à endoscopia digestiva alta (EDA), os diagnósticos mais prevalentes foram: doença do refluxo gastroesofágico, esofagite e gastrite. Estudo nacional de manometria esofágica em 28 pacientes com ES encontrou anormalidades neste exame em 86% dos pacientes, representados sobretudo por hipomotilidade do corpo distal do esôfago em 82% dos casos⁽²⁴⁶⁾. Neste grupo de pacientes,

as manifestações gastrointestinais foram frequentes, com queixas de disfagia, pirose e regurgitação respectivamente em 71%, 43% e 61% dos pacientes ⁽²⁴⁶⁾. Outros estudos brasileiros encontraram uma prevalência variável de distúrbios esofágicos entre 58,7% a 94,7% dos pacientes ^(219, 222). Outros estudos sugerem que os sintomas mais frequentes referidos por pacientes com ES estavam relacionados às manifestações esofagianas e anorretais ^(247, 248). No entanto, apenas 2 pacientes com ES neste estudo relataram queixas de incontinência fecal, sendo um da forma limitada e outro da difusa.

Quase metade dos pacientes com ES apresentava alguma manifestação cardiopulmonar no presente estudo, quando analisados através de ecocardiografia (ECO) ou tomografia computadorizada de alta resolução de tórax (TCAR). Verificou-se que a pressão estimada da artéria pulmonar (PSAP) dos pacientes com a forma limitada foi significativamente maior do que aquela dos pacientes com a forma difusa ($38,13 \pm 2,57$ mmHg *versus* $22,25 \pm 6,45$ mmHg). Ademais entre os 60 pacientes avaliados neste estudo, 6 eram portadores de HAP (10,0%), constatou-se ainda que 5 destes eram da forma limitada. Grosso e cols analisaram as alterações ecocardiográficas em pacientes com ES e encontraram menor distensibilidade ventricular, como consequência provável da maior pressão pulmonar e de danos intrínsecos do miocárdio ⁽²⁴⁹⁾. Trabalho nacional de avaliação da hipertensão pulmonar na ES encontrou a prevalência de 28%, principalmente na forma difusa ⁽²⁵⁰⁾. Descreve-se que a maior complicação observada nos pacientes com a forma limitada tardia da ES (evolução superior a 10 anos) é o aparecimento da HAP, particularmente nos pacientes com positividade para os anticorpos anti Th/To e anti U3 RNP ⁽²⁰³⁾. HAP está presente em 6 a 60% dos pacientes, mais comumente associada à doença pulmonar grave e fibrose, contudo pode ocorrer isoladamente ⁽²⁵¹⁾ usualmente na forma limitada. Atualmente, os principais marcadores de HAP isolada são CD40L sérico, NT-ProBNP, progenitores circulantes de células endoteliais, endotelina A e anticorpos anticardiolipina ⁽²⁵²⁾. Neste estudo porém, a prevalência de síndrome antifosfolípide associada foi baixa (3,33%), embora os anticorpos anticardiolipina tenham sido observados em até 11,67% dos pacientes.

Outra questão cardiopulmonar importante refere-se ao encontro neste estudo, do predomínio de fibrose pulmonar em 19 pacientes contra o padrão “vidro fosco” em 8 pacientes que apresentavam alterações na TCAR de tórax. Entre os pacientes com fibrose pulmonar houve predomínio da forma difusa da doença. Relata-se que a prevalência da doença intersticial pulmonar na ES varia de 25 a 90%, dependendo dos métodos utilizados na sua investigação e mais de 60% dos pacientes vão apresentar alguma forma de lesão pulmonar

ao longo da evolução da doença ⁽²⁵³⁾. Estudo brasileiro de causas de mortalidade em uma coorte com 947 pacientes com ES encontrou o predomínio de envolvimento pulmonar (48,1%); entre os óbitos relacionados com este envolvimento orgânico, a fibrose pulmonar (FIP) e HAP representaram cada uma 16,3% das causas e em 15,5% dos casos, ambas condições estavam presentes e contribuíram para o óbito ⁽²²²⁾. Ainda Barnes e Mayes reportaram entre 284 pacientes com ES que evoluíram a óbito, que 19% faleceram em decorrência de FIP e 14% devido HAP ⁽²²⁷⁾. Neste estudo, observou-se que 25 pacientes (41,7%) apresentavam diminuição da capacidade vital funcional pulmonar (CVF), sendo 7 pacientes com déficit moderado a grave (11,6%); destes pacientes mais graves, 4 eram da forma difusa e 3 da forma limitada.

Como relatado previamente neste estudo, apenas uma paciente (1,7%) da forma limitada apresentou crise renal esclerodérmica (CRE) e a mesma não fazia uso de corticóides. Estudo nacional de sobrevida de 947 pacientes com ES encontrou a prevalência de CRE em 2,6% dos pacientes, sendo que a CRE foi responsável por 10,9% dos óbitos neste grupo de pacientes ⁽²²²⁾.

5.3 – Associação de neoplasia em paciente com ES

No presente estudo, diferentemente da literatura, verificou-se a ocorrência de câncer (neoplasia intra epitelial cervical) em apenas uma paciente (1,7%) da forma limitada da doença, sendo submetida a ressecção cirúrgica. A paciente apresentava 9 anos de evolução da doença, porém longo tempo de fenômeno de Raynaud previamente ao diagnóstico (24 anos), estava em uso de imunossupressor (azatioprina) e já havia sido submetida a 12 pulsoterapias com ciclofosfamida por comprometimento pulmonar e gastrointestinal.

Em coorte de 947 pacientes brasileiros com ES, o câncer foi a causa de óbito em 13,8% dos casos, representados sobretudo por neoplasia pulmonar ⁽²²²⁾. Olensen e colaboradores, acompanhando 2040 pacientes dinamarqueses com ES em média por 6,4 anos, encontraram 222 casos de câncer, o que resultou em risco relativo (RR) de 1,5 nesta população ⁽²⁵⁴⁾. Verificou-se que os homens apresentaram em geral um maior risco de desenvolvimento de câncer do que mulheres, sendo os mais prevalentes o pulmonar e hematológico ⁽²⁵⁴⁾. Recentemente, duas meta-análises ^(255, 256), uma das quais com mais de

7000 pacientes com ES ⁽²⁵⁶⁾, encontraram resultados idênticos, com maior risco de câncer em homens, principalmente pulmonares e hematológicos, bem como riscos relativos semelhantes (respectivamente RR=1,41 e 1,75), além do que não foi observado diferenças de RR entre as formas difusa e limitada para o desenvolvimento de câncer ⁽²⁵⁵⁾. Embora a ocorrência de neoplasias pulmonares ou hematológicas não tenha sido verificada neste estudo, nos últimos 5 anos observou-se neste Serviço de Reumatologia o óbito de 2 pacientes do sexo feminino com a forma difusa da ES, em decorrência de câncer pulmonar (dados não publicados).

Os mecanismos propostos para explicar a maior susceptibilidade dos pacientes portadores de doenças autoimunes desenvolverem neoplasias são: alteração da vigilância e da destruição imunológica de células cancerígenas, possível associação de infecções e proliferação linfocitária não controlada por oncogenes, bem como a terapêutica utilizada no tratamento das doenças reumatológicas com potencial cancerígeno, especialmente imunossupressores alquilantes ⁽²⁵⁷⁾. A paciente deste estudo que apresentou câncer, utilizou anteriormente ciclofosfamida e vinha atualmente sendo medicada com azatioprina.

5.4 – Alterações laboratoriais observadas em pacientes com ES

Em relação aos exames laboratoriais realizados nos pacientes, observou-se a presença do anticorpo antinuclear (AAN) em 95% dos pacientes, similar à maioria dos estudos nacionais ^(120, 219, 222, 223, 236) e outras regiões do mundo ^(220, 228, 233, 234, 258, 259, 260). Os principais padrões observados foram nuclear centromérico, nuclear pontilhado fino e nuclear quase homogêneo. Bernstein e cols descreveram a positividade do ANA em 97% dos pacientes com ES, representados principalmente pelo padrão pontilhado fino e centromérico, além da observação de associação com o padrão nucleolar (pontilhado e homogêneo) em 33% dos pacientes ⁽²⁶⁰⁾. Hesselstrand e cols relataram positividade do ANA em 84% dos pacientes com ES, sendo os padrões mais observados: pontilhado fino (41%), homogêneo (25%), nucleolar (24%) e centromérico (18%) e, interessantemente, o padrão nucleolar se correlacionou com pior sobrevida nestes pacientes, provavelmente por aparente risco ligeiramente aumentado de desenvolvimento da crise renal esclerodérmica ⁽²⁵⁸⁾. Estudo de coorte da Europa central identificou que cinco antígenos (centrômero, topoisomerase I, Pm/Scl, U1-RNP e RNA polimerase) foram responsáveis por mais de 95% das respostas associadas ao ANA na ES ⁽²⁵⁹⁾.

Em relação aos anticorpos específicos para ES observados nesta pesquisa, observou-se positividade do anticentrômero (ACA), anti DNA topoisomerase I (anti Scl70) e anti RNA polimerase III (anti POL 3) respectivamente em 41,7%, 26,7% e 11,7% dos pacientes, sendo as porcentagens comparáveis aos dois estudos realizados na região Sul do Brasil ^(120, 219), embora Müller e cols encontrassem valores surpreendentemente elevados de anti POL 3 (41,18%) ⁽¹²⁰⁾. Neste estudo, nenhum paciente estudado apresentou positividade para anti Pm/Scl, embora tenham sido identificados três pacientes com diagnóstico de sobreposição com miopatia inflamatória, com elevação de CPK e alterações eletroneuromiográficas compatíveis em todos estes pacientes. Fundamenta-se tal achado porque os anticorpos anti Pm/Scl são observados somente em cerca de 3% dos pacientes portadores de ES ⁽⁶⁷⁾ e tão somente em cerca de 25% dos pacientes esclerodérmicos com sobreposição com miosite ⁽¹¹²⁾.

Neste trabalho, 48 dos 60 pacientes (80%) apresentou positividade para pelo menos um dos 3 autoanticorpos específicos para ES (Scl 70, ACA ou anti POL 3). Relata-se na literatura, que a prevalência de autoanticorpos altamente específicos, associados com a ES ou com síndromes de sobreposição com características de ES, é elevada nos pacientes esclerodérmicos, representados principalmente por ACA e anti Scl70 ^(258, 259, 260), inclusive na população esclerodérmica brasileira ^(120, 219). Embora os trabalhos relatem que a coexistência entre estes autoanticorpos específicos seja rara em pacientes com ES (1,6%) ^(258, 259, 260), foi observado neste estudo que 2 pacientes (3,3%) tinham positividade concomitante de autoanticorpos específicos, sendo que um paciente da forma difusa apresentou positividade concomitante para anti Scl70 e anti POL 3 e outro paciente da forma limitada apresentou positividade concomitante para ACA e anti POL 3.

No presente estudo, os anticorpos adicionais mais prevalentes foram anti U1 RNP (anti RNP) (16,7%) e anti Ro (SSA) (11,7%), que pode ser explicado devido a ocorrência de síndromes de sobreposição (principalmente com LES) e síndrome de Sjögren associado a estes pacientes. Neste grupo de pacientes com sobreposição, surpreendentemente observou-se menor gravidade (3,8 *versus* 6,1 da forma difusa e 4,9 da forma limitada) e atividade de doença (2,0 *versus* 2,8 da forma difusa e 2,2 da forma limitada), bem como manifestações clínicas cardiopulmonares e renais mais brandas. Descreve-se na literatura que autoanticorpos adicionais e não específicos foram encontrados em até 55,4% dos pacientes, representados sobretudo por anti Ro (SSA), anti La (SSB) e anti mitocôndria ⁽²⁵⁹⁾.

Como previamente relatado, a prevalência do anticorpo anti RNP tem sido

descrita em até 35% dos pacientes, mas geralmente associado à DMTC ^(107, 108, 112). Embora se descreva na literatura que a frequência da positividade do anti RNP seja maior nos pacientes com a forma limitada de ES ⁽²⁶¹⁾, encontrou-se neste estudo uma maior prevalência deste anticorpo em pacientes com sobreposição com outras doenças (principalmente LES) seguida de pacientes com a forma difusa. Neste estudo, 80% dos pacientes com anti RNP positivo eram da cor parda, em concordância com trabalhos prévios que descrevem maior frequência de anti RNP em pacientes afro-americanos ⁽²⁶²⁾. Embora seja conhecida a associação entre positividade do anti RNP com inflamação muscular na literatura ⁽²⁶²⁾ em conformidade com os pacientes do presente estudo; a correlação deste anticorpo com envolvimento articular ⁽²⁶¹⁾ e fibrose pulmonar nos pacientes com ES ^(261, 263) diferentemente dos estudos prévios, não foi observada neste trabalho.

Por outro lado, embora tenha se observado na literatura que sintomas de síndrome *sicca* ocorreram em 68% dos pacientes com ES, a prevalência de síndrome de Sjögren definida pelos critérios do consenso do grupo ACR/EULAR foi tão somente 14%, marcadamente associada com a forma limitada da ES ⁽²⁶⁴⁾. No presente estudo, 11,7% dos pacientes foram diagnosticados com síndrome de Sjögren através dos mesmos critérios, porém, eles eram predominantemente da forma difusa (71,4%). Entre os 60 pacientes com ES desta pesquisa, 37 se queixavam de xerofthalmia (61,7%) e 34 se queixavam de xerostomia (56,7%), no entanto entre os 7 pacientes com síndrome de Sjögren associada à ES, todos tinham xerostomia e xerofthalmia. Sugere-se que a síndrome de Sjögren esteja associada e não secundária à ES ⁽²⁶⁵⁾, por apresentar manifestações distintas neste grupo, como maior ocorrência de neuropatia e artrite ⁽²⁶⁵⁾, bem como menor gravidade e envolvimento pulmonar ^(265, 266), o qual não foi observado neste trabalho. Embora esta associação pareça ser uma entidade distinta com menor envolvimento orgânico, relata-se maior risco de desenvolvimento de linfoma ⁽²⁶⁷⁾, o qual também não se observou neste estudo.

Elevação de provas inflamatórias (VHS e PCR) foram observadas em quase metade dos pacientes (respectivamente 41,7% e 45%) e representou a correlação com doença ativa persistente observada nos pacientes, uma vez que 31,7% dos mesmos apresentaram elevada atividade aferida pelos critérios de Valentini ^(205, 207). Muangchan e cols encontraram elevação de PCR em 25,7% dos pacientes com ES e de VHS em 38,2%, especialmente nos pacientes recém diagnosticados com a doença ⁽²⁶⁸⁾. Outros estudos descrevem ainda associação significativa do PCR com o VHS, escore cutâneo modificado de Rodnan, piores parâmetros de função pulmonar, atividade da doença e dano vascular, bem como com o HAQ

dos pacientes ^(252, 269). Já se conhece o papel do VHS como marcador prognóstico, uma vez que elevações superiores a 25mm/h foram preditoras de morte em análises uni ou multivariadas ^(240, 252, 269, 270). Há evidência de que a resposta de fase aguda pode ser menor na ES em comparação com outras doenças inflamatórias, embora o VHS deva ser considerado como um valioso reagente de fase aguda e o PCR como uma alternativa ^(240, 268, 269).

Observou-se no estudo a diminuição dos componentes do complemento sérico C3 e C4 apenas em 3,3% dos pacientes com ES. Embora a hipocomplementenemia seja um dos itens que compõe o índice de atividade da ES ^(109, 205), ela não é comumente considerada como um parâmetro laboratorial característico da ES ⁽²⁰⁶⁾. Não ocorre depósito significativo de complemento na histopatologia dos pacientes esclerodérmicos, tal como observado no LES, contudo relatou-se anteriormente ativação anormal do complemento e depósito subendotelial de imunocomplexos em pacientes com ES ⁽²⁷¹⁾. A ocorrência de diminuição do complemento sérico foi variável em outros estudos (12 a 22,5%) ^(206, 272) e se observou que os pacientes com ES tinham deficiência em prevenir a formação de imunocomplexos ⁽²⁷³⁾. Como este defeito, relacionado a diminuição dos níveis da proteína C4a, foi especialmente proeminente na fase precoce e ativa da patologia, sugere-se ao complemento um papel patogênico ⁽²⁷³⁾. Senaldi e cols encontraram ativação do complemento na ES, principalmente na forma difusa e que refletia a gravidade clínica dos pacientes ⁽²⁷⁴⁾. Cuomo e cols encontraram associação na ES entre hipocomplementemia e índice de atividade da doença, incapacidade funcional, gravidade das manifestações gerais, envolvimento cutâneo, vascular, cardíaco e pulmonar ⁽²⁷²⁾, mas não foram observadas neste estudo estas correlações. Consideravelmente, Batal e cols identificaram um padrão finamente granular de depósito de C4d na região peritubular capilar de um subtipo de pacientes com ES que evoluiu com crise renal ⁽²⁷⁵⁾ e houve correlação com pior prognóstico renal, sugerindo-se um mecanismo de lesão renal induzida por anticorpos e complemento nestes pacientes ⁽²⁷⁶⁾. No entanto, a única paciente com crise renal deste estudo, não apresentava hipocomplementenemia. Em pacientes com longa evolução da doença, é possível que a produção de citocinas pelos linfócitos T e B, tenha um papel mais importante na inflamação e remodelamento da matriz, do que a participação do complemento.

Portanto, observando-se as características sócio demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com ES na região Centro Oeste, pode-se concluir que a esclerose sistêmica é uma doença importante e de alta morbimortalidade, porém pouco estudada no estado de Mato Grosso do Sul, que pode se manifestar clínica e laboratorialmente de forma

extremamente variável, com indiscutível participação da autoimunidade, caracterizada por alterações inflamatórias e fibróticas associadas à endarterite proliferativa e lesões vasculares comprometendo pele, sistema musculoesquelético e órgãos internos, principalmente trato gastrintestinal, pulmões, rins e coração.

5.5 Análise do anticorpo anti COL V em 60 pacientes com ES do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da FMUFMS

A importância do COL V, objeto desta pesquisa, reside no fato do mesmo participar ativamente da etiopatogênese da ES. De forma direta, os epítomos de COL V exógenos ou endógenos podem atuar sobre as células endoteliais causando apoptose, ou atuar indiretamente, através da perpetuação da síntese de anti COL V, que ao originar imunocomplexos COL V-anti COL V, permaneceriam agredindo o complexo endotélio-membrana basal ^(140, 179, 195, 277).

Este trabalho mostrou frequência baixa de positividade de anti COL V (8,3%). Acredita-se que a baixa incidência de anti COL V encontrada nesta população com ES tenha sido reflexo do estadiamento clínico da enfermidade, ou seja, a maioria dos doentes era seguida há muito tempo e encontrava-se estabilizada clinicamente. O tempo de acompanhamento médio dos pacientes foi de 9 anos e apenas 7 pacientes tinham a forma precoce da doença.

Em relação às alterações patológicas observadas na ES, o grupo de pesquisa do LIM-17 do HCFMUSP observou no modelo de esclerose sistêmica em coelhos induzido por meio da imunização com COLV, bem como nos pulmões e derme dos pacientes com ES, a ocorrência de um depósito aumentado de COLV, porém de morfologia fibrilar atípica, sob a forma de fibras espessas e distorcidas ^(140, 179, 195). Estudo prévio realizado por Riente e colaboradores detectaram anticorpos séricos anti colágenos nativos e desnaturados em um terço dos pacientes com ES ⁽¹³²⁾. Ponderaram que autoanticorpos reagindo contra colágenos IV e V da membrana basal, poderiam contribuir para o dano tecidual, uma vez que qualquer lesão que expõe os constituintes da membrana basal pode acarretar em formação de imunocomplexos e fixação de complemento contra estes componentes ⁽¹³²⁾.

Embora ambos estudos tenham pesquisado apenas anticorpos anti colágeno da classe IgG, outro aspecto interessante que pode explicar a discordância entre estes resultados com os de Riente e colaboradores ⁽¹³²⁾, foi que nesta pesquisa utilizou-se como antígeno do ensaio ELISA, apenas COL V modificado após tratamento prévio com mercaptoetanol ou desnaturado pelo aquecimento. Na experiência do grupo LIM-17 do HCFMUSP, tanto os soros de coelhos do modelo experimental como pacientes com ES, só reagiram com COL V desestruturado ⁽¹³⁸⁾. Este fato revela que, tanto nos animais do modelo experimental como nos pacientes com ES, provavelmente só ocorra exposição de fragmentos de COL V com morfologia atípica nos tecidos acometidos. Ou seja, não há como justificar presença de molécula de COL V nativa íntegra, na matriz extracelular de tecidos com ES desestruturados pela ação enzimática, que se segue à lesão do complexo endotélio-membrana basal. Assim, tratamento prévio do COL V nativo pelo mercaptoetanol ou calor, estaria simulando a digestão enzimática e exposição de epitopos ocultos, que ocorreria nos tecidos de pacientes com ES.

Segundo pesquisadores do LIM-17 do HCFMUSP, o surgimento do anti COLV seria consequente a uma lesão células endoteliais, as quais poderiam permitir o influxo de células da imunidade inata, ocasionando liberação de enzimas proteolíticas que degradariam as fibras heterotípicas de colágeno, com exposição de COLV próprio previamente oculto, suscitando a formação de neo-antígenos ^(140, 179, 180). Após capturados por células apresentadoras de antígenos, esses fragmentos ativariam as células T e células B produtoras de autoanticorpos, induzindo uma resposta específica predominantemente Th2, mas também Th17, desta forma perpetuando a lesão endotelial mediada por anticorpos anti COLV ^(140, 179, 180). Martin destaca a hipótese de que o próprio COLV endógeno poderia atuar como um agente indutor de apoptose e de ativação das células vasculares endoteliais, contribuindo novamente com a perpetuação do dano vascular ⁽¹⁷⁹⁾.

Como relatado anteriormente, a relevância do estudo do COL V em pacientes com ES, decorre do fato da molécula desempenhar possível papel na patogênese da doença ativa, principalmente nas fases iniciais, quando são maiores as chances de se identificar anticorpos anti COL V ⁽²⁷⁷⁾. Além disso, as complicações tardias como fibrose pulmonar, hipertensão pulmonar e nefropatia, embora exibam aspectos histológicos de irreversibilidade, podem indicar ocorrência de reativação da doença e assim exibir presença de COL V exposto em tecidos e suscitar aparecimento de anti COL V no soro dos pacientes com ES ^(40, 138, 195, 278).

Fato interessante observado com os anticorpos anti COLV, foi que, tal como observado no fenômeno pró-zona com os anticorpos antinucleares (AAN), reações falso negativas podem ocorrer na presença de imunocomplexos, devido a presença de complexos antígeno-anticorpo no soro que impedem a reação. Por isso, é necessário remover o excesso de conjugado. A prévia adsorção dos soros dos animais e pacientes com tecidos de coelhos imunizados inibe a reação sorológica anti COLV (ELISA). Ao contrário, os soros não são adsorvidos com tecido de coelho normal e o anti COLV se positiva (dados não publicados do grupo de pesquisa do LIM-17 do HCFMUSP).

Outro dado interessante é o encontro de anticorpos anti COLV em outras enfermidades do conjuntivo com características de dano endotelial e autoimunidade, como é o caso de positividade em 38,1% dos pacientes com LES (amostra de 42 pacientes), em 20% dos pacientes com doença mista do tecido conjuntivo (amostra de 50 pacientes) e em 15,3% de outra população com 85 pacientes com ES. Encontrou-se menor prevalência em outras doenças do conjuntivo e artrites, como por exemplo, anti COLV positivo em 6,5% com síndrome de Sjögren (amostra de 46 pacientes), 5,7% dos pacientes com artrite psoriásica (amostra com 35 pacientes) e 5,6% em pacientes com artrite reumatóide (amostra com 36 pacientes). Ao contrário a frequência é baixa em outras doenças, como nas miopatias inflamatórias, onde se observou positividade do anti COLV em 2,8% dos pacientes (amostra com 36 indivíduos) e de forma surpreendente, todas as amostras foram negativas para o anticorpo na doença de Behçet; uma vez que a doença foi incluída no grupo das vasculites primárias, esperava-se que fosse encontrado alta positividade do anti COLV relacionado ao dano vascular. Ademais, não se observou positividade do anticorpo na espondilite anquilosante (amostra com 32 pacientes), bem como na artrose e como se esperava no grupo controle normal. Inclusive nestas enfermidades citadas, a presença do anti COLV variou com o estadiamento clínico da enfermidade e a positividade sugere estar associada com presença do anti COL IV (dados não publicados do grupo de pesquisa do LIM-17 do HCFMUSP). Estes dados indicam que o anticorpo anti COLV seria um bom marcador para indicar lesão do complexo endotélio-membrana basal, com potencial envolvimento inflamatório da MEC. A questão é saber porque na ES a lesão é contínua, enquanto em outras enfermidades sugere ser transitória. Possivelmente esse fenômeno ocorre por se tratar de processo fisiopatológico distinto, já que a ES é a única enfermidade caracterizada por exibir três processos fisiopatológicos diferentes (vasculopatia, autoimunidade e fibrose tecidual)^(3, 4). Outra consideração pertinente seria o tempo de agressão ao endotélio, que ocorre muito

precocemente na ES, muitas vezes até anos antes do diagnóstico clínico, principalmente nas formas limitadas da doença ^(37, 279).

Estes dados indicam que, o anticorpo anti COL V seria um bom marcador para indicar dano vascular, com posterior dano matricial e exposição de antígenos ocultos, como fragmentos do COL V ^(39, 138, 140, 179). Infelizmente, não se dispõe de estudo sequencial da pesquisa de anti COL V num mesmo paciente. Postula-se que na ES e talvez na DMTC, a persistência do anticorpo anti COL V ocorra por período prolongado, perdurando pelo período da existência do desarranjo matricial com exposição de COL V anômalo, que coincidiria com o período de atividade da enfermidade ^(138, 277). É possível que, novas pesquisas futuras, possam identificar anti COL V em casos muito precoces de ES, antes até mesmo do início dos sintomas clínicos, principalmente nas formas limitadas da doença. Interessante que, Riente e cols identificaram anti COL V em 8% dos pacientes com fenômeno de Raynaud primário ⁽¹³²⁾, sugerindo que a presença deste anticorpo poderia prever aparecimento de ES, e, em particular, de uma forma ativa e mais grave da doença.

A presença de anti COL V nos soros dos pacientes com enfermidades reumatológicas, sugere ocorrência de atividade inflamatória clínica com dano endotelial, mas não pode ser considerado como marcador específico de nenhuma enfermidade ⁽¹⁷⁸⁾.

Verificou-se na literatura que não existe nenhum estudo publicado correlacionando a ocorrência do anticorpo anti colágeno tipo V em pacientes com ES com a atividade e gravidade da doença nestes pacientes, fato que impulsiona ainda mais a realização deste trabalho, contribuindo para fornecer subsídios que corroborem o papel essencial deste anticorpo como novo biomarcador da ES, que poderia favorecer o desencadeamento inicial da autoimunidade, contribuir com a perpetuação da patologia e orientar no tratamento da enfermidade. A relevância do estudo do COLV em pacientes com ES se deve ao fato da molécula possivelmente desempenhar um importante papel na patogênese da doença, principalmente nas fases iniciais, quando são observados anticorpos direcionados a ela (anti COLV) ⁽²⁷⁷⁾.

Como relatado previamente neste estudo, apenas uma paciente (1,7%) da forma limitada apresentou crise renal esclerodérmica (CRE), interessantemente a mesma apresentava positividade para o anti COLV e não fazia uso de corticóides. Esse dado foi extremamente importante, uma vez que atingiu significância estatística, embora com baixa casuística, podendo representar um novo biomarcador de atividade da doença e acometimento renal. Especula-se portanto, a associação deste anticorpo com a CRE, sendo sugerido dosar o

anti COLV em uma coorte com mais pacientes esclerodérmicos com acometimento renal. Estudo nacional de sobrevida de 947 pacientes com ES encontrou a prevalência de CRE em 2,6% dos pacientes, sendo que a CRE foi responsável por 10,9% dos óbitos neste grupo de pacientes ⁽²²²⁾.

Neste trabalho, a única paciente com CRE apresentava positividade ao anti COLV. Neste caso, pode-se explicar a lesão renal relacionada ao anti COLV através do mecanismo fisiopatológico de deposição de imunocomplexos COLV-anti COLV no mesângio renal, que é rico em COLV ^(275, 276), com ativação do complemento e lesão direta da membrana basal, com exposição de mais epítomos de COLV e perpetuação do processo patológico, ocasionando acúmulo de componentes da MEC e isquemia. No entanto, a paciente com CRE era da forma limitada com 9 anos de evolução da doença e não apresentava hipocomplementenemia. Corroborando outra hipótese plausível, relata-se achado prévio que indica que o complemento talvez não seja fundamental na fase tardia deste processo, pois a hipóxia *per se* poderia promover produção de MEC e estaria ativamente envolvida na patogênese de desordens pró-fibróticas como a ES, com ativação de um grande número de genes codificadores de colágeno que foram induzidos pelas células endoteliais após isquemia ⁽⁴⁾.

Na CRE, observa-se um vasoespasma sobreposto às lesões proliferativas intimaais, resultando na isquemia do aparelho justa-glomerular, com estímulo à secreção de renina e angiotensina II, que em última análise acarreta em aumento da vasoconstrição renal ⁽²⁸⁰⁾. Mais ainda, autoanticorpos funcionais contra receptores vasculares, como anti receptor tipo A de endotelina 1 (ET-1) e anti receptor tipo 1 de angiotensina II, foram descritos em pacientes com ES e houve associação positiva entre os maiores níveis de ambos autoanticorpos e manifestações mais graves da doença, incluindo crise renal esclerodérmica e hipertensão pulmonar ⁽⁴⁹⁾. Descreve-se um padrão de coloração endotelial de ET-1 em ambos os glomérulos e arteríolas renais dos pacientes, que parece ser específica de CRE ⁽²⁸¹⁾ associada a superexpressão de ET-1 ^(275, 281).

Martin demonstrou correlação positiva entre o COLV e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) expresso nas células endoteliais, e postulou que sob influência da ET-1 e sob regime de hipóxia, as células endoteliais expressariam o CTGF, a qual contribuiria para a síntese excessiva de COLV. Observou-se no modelo de ES induzido por COLV, alterações nos glomérulos renais, tais como discreta proliferação mesangial e espessamento da membrana basal, além de moderado depósito de colágeno intersticial (COLV) ⁽¹³⁸⁾. A fibrose

nos compartimentos glomerular e tubulointersticiais, ocasionados pelo acúmulo de constituintes da MEC incluindo o COLV, bem como a desregulação na expressão do receptor de ET-1, também pode incentivar a progressão da doença renal ⁽¹³⁸⁾.

Destaca-se novamente a importância e possível utilidade do anti COLV na detecção precoce de HAP, dado que, dos seis pacientes portadores de HAP, dois apresentavam anti COLV positivo (tendência estatística com $p=0,074$ pelo teste exato de Fisher). Observou-se ainda, embora sem relevância estatística, diferenças entre os valores médios da PSAP, sendo maiores nos pacientes com positividade para o anti COLV e inferiores nos quais o anticorpo foi negativo ($39,50 \pm 2,50 \text{ mmHg}$ *versus* $31,50 \pm 3,98 \text{ mmHg}$). Uma terceira ponderação significativa foi que uma paciente, com a forma limitada da ES, inicialmente encontrava-se assintomática e com anti COLV negativo e após 6 meses iniciou sintomas de dispnéia aos médios esforços, submetida a ECO compatível com HAP (PSAP de 42 mmHg) e posterior confirmação por cateterismo cardíaco, logo após o anti COLV tornou-se positivo.

Do mesmo modo, pode-se explicar a tendência estatística de HAP observada neste estudo nos pacientes com positividade para anti COLV através do mesmo mecanismo fisiopatológico, uma vez que o COLV é encontrado na membrana basal do endotélio e também do epitélio brônquico pulmonar. Marangoni demonstrou expressão aumentada de COLV na camada íntima e na média da artéria pulmonar no modelo experimental de ES induzido pelo colágeno tipo V, além de aumento significativo na densidade e na atividade das células endoteliais nos vasos intrapulmonares destes animais ⁽¹⁹⁵⁾. A autora destaca a identificação precoce de dano e ativação endotelial, que ocorreu aos 7 dias da primeira imunização com COLV ⁽²⁷⁸⁾. Como a observação de fibrilogênese foi muito precoce e não pode ser explicada pela ativação da resposta imune, Marangoni sugere que o próprio COLV foi a substância responsável pela ativação endotelial, acarretando liberação de citocinas pró-fibróticas como TGF- β e ET-1, levando à estimulação dos miofibroblastos com produção de componentes da MEC, incluindo o próprio COLV. Surpreende ainda o encontro pela autora de aumento precoce de expressão de ET-1, o que contribuiria para o desbalanço entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, resultando em alteração na complacência da artéria pulmonar, a qual já foi observado em pacientes com ES e explicaria a ocorrência de HAP no modelo experimental e em humanos ^(195, 278).

No presente estudo, não foi encontrada nenhuma associação estatística entre a positividade do anti COLV com os demais anticorpos específicos da ES (ACA, anti Scl70 e

anti POL 3) e este dado é original. Riente e colaboradores encontraram a prevalência de anti COLV em 31% de pacientes com ambas formas clínicas da ES, no entanto, não houve correlação com outros autoanticorpos associados ⁽¹³²⁾. Devido o encontro do anti COLV em variadas doenças, que se apresentam com características fisiopatológicas comuns de dano endotelial, tais como LES, ES e diversas vasculites primárias ⁽¹⁷⁸⁾, assim seria mais provável que a autorreatividade ao COLV, que é componente da membrana basal das células endoteliais, contribuiria para a perpetuação de dano vascular adicional em ambas as formas de ES.

O caráter inédito e a maior contribuição do presente estudo é de, pela primeira vez, fornecer dados de correlação entre um novo e potencial biomarcador (anti COLV) com o questionário de avaliação de saúde (*sHAQ*), bem como com os critérios de gravidade e de atividade da doença.

O *HAQ* é uma medida de função na ES, sendo ferramenta útil para a avaliação de deficiência física funcional ⁽²⁸²⁾ e o impacto da doença no bem estar físico e mental dos pacientes ⁽²⁸³⁾. Embora tenha sido observado neste estudo, através do *HAQ*, escores de incapacidade mais elevados nos pacientes que apresentavam positividade do anti COLV, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, os índices encontrados foram semelhantes aos descritos em outras populações ^(241, 282). No Brasil, outros instrumentos de mensuração da qualidade de vida foram validados em pacientes com ES, como o *12-Item Short-Form Health Survey* (SF-12), demonstrando uma redução da qualidade de vida em todos os domínios avaliados, com maior impacto no domínio físico ⁽²⁸⁴⁾. Morita e colaboradores ⁽²⁴¹⁾ relataram que os pacientes com a forma difusa da ES apresentavam os maiores índices de incapacidade no *HAQ*, superiores aos dos pacientes com AR, LES e outras doenças do colágeno. Observou-se ainda que pacientes com ES e envolvimento articular tinham pontuações maiores no *HAQ* do que pacientes com artrite psoriásica, enquanto o domínio dor foi maior em pacientes com ES do que com AR ⁽²⁸⁵⁾. Recentemente Iudici e colaboradores encontraram que os pacientes com a forma precoce de ES, apesar de apresentarem tão somente FRy, já experimentavam um comprometimento da qualidade de vida em ambos domínios físico e mental ⁽²⁸⁶⁾. A utilidade do *HAQ* na avaliação de pacientes com ES foi demonstrado por estudos que reportaram que ele pode prever a evolução e sobrevida nestes pacientes ^(282, 287). Neste trabalho, houve correlação linear positiva significativa, porém moderada, entre o *HAQ* e a atividade da doença, medido através do teste de Pearson. Medsger e cols encontraram que os índices de incapacidade do *HAQ*

apresentavam forte correlação com endurecimento cutâneo, envolvimento cardíaco, contraturas digitais, crepitação tendínea e envolvimento renal em 1000 pacientes com ES ⁽²⁰³⁾.

A gravidade foi definida na ES como o total efeito da doença sobre a função orgânica e apresenta componentes reversíveis ou não; de outro lado, o dano seria o componente da gravidade que é irreversível ⁽²⁰⁴⁾. Em muitas doenças sistêmicas crônicas, como é o caso da ES, é muitas vezes difícil separar a gravidade ou dano da atividade da doença ⁽²⁸⁸⁾. Da mesma forma como observado com o *HAQ*, os pacientes deste trabalho com ES que tinham positividade para o anti COLV, apresentavam uma média dos índices de gravidade mais elevados do que aqueles em que o anticorpo era negativo, todavia não houve significância estatística possivelmente pelo tamanho reduzido da amostra (4,73 *versus* 6,40). Conjuntamente não ocorreram variações significativas nos índices da escala de gravidade após 6 meses, de modo que as médias encontradas nestes dois períodos de avaliação foram idênticas nesta pesquisa. Medsger descreveu subgrupo de pacientes que foram seguidos por 3 anos, sendo examinados a cada 6 meses para composição dos índices de gravidade e verificou-se pequenas variações nos escores ⁽²⁰³⁾. Geirsson e cols destacaram que maiores pontuações na escala de gravidade estavam relacionadas a uma sobrevida menor e os maiores determinantes da pior evolução foram os componentes de extenso endurecimento cutâneo, alterações eletrocardiográficas e redução das funções renal e pulmonar ⁽²⁴²⁾. Em outro estudo, a gravidade e atividade da doença estiveram fortemente relacionadas, especialmente no subgrupo de pacientes com a precoce forma difusa da ES, indicando que a doença ativa estaria associada com pior prognóstico ⁽²⁸⁹⁾. Da mesma forma, os pacientes deste estudo com maior gravidade também tinham significativamente uma maior atividade da doença (4,03 *versus* 1,38).

Entretanto, definir atividade da doença na ES é muito mais difícil do que em outras doenças reumáticas do tecido conjuntivo onde a inflamação desempenha um papel importante, tais como LES e AR ^(206, 207, 208, 290). Isso poderia ser explicado pelo fato de que a evolução na maioria dos pacientes com ES, principalmente aqueles com a forma limitada, tem um curso extremamente indolente sem sinais clínicos ou laboratoriais de inflamação ^(206, 291); a ES pode evoluir de forma imprevisível e inclusive ocorrer potencial reversão espontânea ou sob tratamento ⁽²⁹⁰⁾; ademais a forma difusa da doença é caracterizada por um predomínio de excessiva fibrose tecidual em detrimento da inflamação ^(207, 291).

A despeito dessa dificuldade, definir a atividade na ES é um assunto de extrema importância ⁽²⁹⁰⁾, visto que possibilitaria ao clínico distinguir pacientes que requerem

tratamento agressivo daqueles nos quais o tratamento sintomático poderia ser suficiente e a agressividade traria riscos adicionais desnecessários⁽²⁰⁶⁾. Consequentemente, existe uma grande necessidade em encontrar biomarcadores que possam refletir fielmente tanto a atividade global quanto a órgão-específica e numerosos candidatos tem sido estudados, porém com resultados controversos^(203, 207, 240, 288). Sugere-se neste estudo a inclusão do anti COL V como medida de atividade de doença.

Contando que ainda não foi identificada na ES uma convincente terapia modificadora da doença e dados os possíveis efeitos colaterais das medicações, seria aconselhável reservar as intervenções terapêuticas aos pacientes com doença grave e ativa^(119, 292). Aliás, tem sido demonstrado que o tratamento farmacológico é mais efetivo quando iniciado precocemente no curso da doença⁽²⁹²⁾, preferivelmente durante o estágio inicial de inflamação ou autoimunidade⁽²⁰⁴⁾, e os indivíduos diagnosticados precocemente tem maior probabilidade de sobrevivência^(228, 242). Deste modo, seria muito recomendável a disponibilidade de instrumentos de triagem que pudessem identificar precocemente os pacientes com doença ativa^(207, 270, 293, 294). O COLV, por indicar dano endotelial precoce e se correlacionar com a atividade da doença, representa um fiel indicador de necessidade de tratamento do paciente com ES, a fim de evitar o agravamento da enfermidade e evolução para a fase irreversível de fibrose tecidual.

No presente trabalho, os escores de atividade da doença foram semelhantes aos observados na literatura^(287, 290), bem como o envolvimento de cada órgão no cálculo da pontuação da atividade da doença, com maior acometimento cutâneo seguido pelo vascular e menor prevalência gastrointestinal, pulmonar e articular⁽²⁰⁹⁾. Procurou-se neste estudo confirmar o achado prévio de Martin e cols, que demonstraram uma correlação entre a atividade da doença e a presença de COLV anômalo na derme de pacientes com ES⁽¹⁷⁹⁾. A hipótese inicial seria que o COLV encontrado nas fases iniciais e ativas da patogênese da ES, suscitaria uma resposta imunológica contra as proteínas anômalas, com formação de anti COLV, o que perpetuaria o dano vascular observado inicialmente. De fato, este estudo revalidou o papel do anti COLV como marcador sorológico de atividade da doença, enquanto um outro efetivo marcador histológico de atividade precoce na patologia seria o encontro de COLV anômalo em pacientes com ES⁽¹⁷⁹⁾.

Embora 60% dos pacientes com anti COLV positivo apresentassem elevação de provas inflamatórias, não se concretizou a expectativa neste estudo de que a elevação de VHS e PCR fosse observada preponderantemente em pacientes com positividade para anti COLV,

devido o anticorpo estar relacionado com a doença ativa e precoce^(179, 277). Tal fato pode ser explicado através do tamanho da amostra, porque apenas 8,3% dos pacientes com ES tinham anti COLV positivo.

Novamente neste estudo, não foi possível encontrar qualquer associação estatisticamente significativa entre queda de complemento e anti COLV devido ao fato de apenas 2 pacientes apresentarem hipocomplementemia. Porém no modelo de ES em coelhos induzido por colágeno V do grupo de pesquisa do LIM-17 do HCFMUSP ocorreu consumo persistente de complemento numa fase precoce⁽¹³⁹⁾. Talvez em pacientes com longa evolução da doença, a produção de citocinas pelas células da imunidade inata e linfócitos T e B, após agressão do endotélio, seja diretamente responsável por modular a inflamação e ocasionar o remodelamento da matriz, sem a participação do complemento, como foi o caso da paciente deste estudo com CRE com evolução de 9 anos da doença e sem hipocomplementemia.

Posto isto, é um fato inédito e de grande relevância demonstrar um novo biomarcador que esteja associado com a atividade da ES. O anti COLV se correlacionou de forma estatisticamente significativa com a atividade da doença e o outro destaque inédito foi a associação significativa com crise renal esclerodérmica (CRE), além disso, observou-se tendência à associação com hipertensão arterial pulmonar (HAP), que poderia ser comprovada em estudos futuros com maior número de pacientes. Apesar de contribuir em muito com a morbi-mortalidade na ES, foram descritos poucos biomarcadores preditores de CRE, como é o caso do anticorpo anti RNA polimerase III (anti POL 3)^(112, 118, 252, 269, 293, 295), o qual ainda carece de especificidade e sensibilidade suficientes, uma vez que 50% dos pacientes com crise renal não produzem este anticorpo e somente 30 a 40% dos pacientes com positividade para anti POL 3 desenvolvem CRE⁽²⁹³⁾.

Conjuntamente, o anti Scl 70 é um importante anticorpo encontrado em pacientes com a forma difusa da ES e que está igualmente associado com a gravidade e atividade da doença⁽¹¹⁵⁾. Todavia salientamos vantagens do anti COLV sobre o anti Scl70 na aferição da atividade da ES, já que o anti COLV foi um marcador mais amplo, encontrado em ambas as formas da doença e principalmente em pacientes com a forma precoce, com menor tempo de doença⁽²⁷⁷⁾. Novamente neste estudo, embora não tenha atingido significância estatística, observou-se que os pacientes com positividade para anti COLV tinham menor tempo de evolução da doença (5,40 *versus* 8,55 anos). Martin e cols encontraram grande aumento na deposição de colágeno de morfologia anômala na derme de pacientes com ES, significativamente houve uma maior expressão do COLV na doença precoce e também

associação com o grau de atividade da doença ⁽¹⁷⁹⁾.

Outra consideração leva em conta que os anticorpos anti colágeno poderiam representar o subproduto de uma resposta imune na ES, caracterizada pela deposição anormal de colágeno. De fato, cultura de fibroblastos de lesões de pele dos pacientes com ES produzem excessiva quantidade de vários componentes da MEC, particularmente hialuronano, colágenos e fibronectina, cujo fenótipo de biossíntese alterada permanece após diversas passagens celulares ⁽²⁹⁶⁾. Porém o COLV é o único a apresentar uma peculiar estrutura molecular, que o torna distinto e mais imunogênico do que todos os outros colágenos fibrilares, uma vez que durante a sua síntese, ele conserva seus domínios terminais globulares e telopeptídeos, porções sabidamente imunogênicas ^(140, 164).

Desse modo, por regular a fibrilogênese, o COLV seria o principal candidato a desempenhar um papel na patogênese da ES, já que moléculas anômalas de COLV participando na composição da arquitetura anormal das fibras heterotípicas poderiam justificar as mudanças nas propriedades da MEC dos órgãos acometidos na ES, principalmente pele e pulmões. Tal analogia poderia ser relacionada ainda com a síndrome de Ehlers-Danlos, em que ocorre apenas uma mutação nas cadeias alfa 1 ou 2 do COLV, ocasionando desestruturação da MEC, com hiperextensibilidade da pele, hipermobilidade articular e fragilidade cutânea ^(150, 152, 153, 154, 155). Ademais, a observação de que o COLV é uma molécula oculta entre as fibras heterotípicas e que ocorre deposição deste colágeno com morfologia anômala na pele de pacientes com ES, sugere fortemente que o COLV seja um personagem importante no desencadeamento de autoimunidade, já que poderia suscitar uma resposta específica (COLV e anti COLV), com formação de imunocomplexos e deposição dos mesmos no endotélio vascular, acarretando dano vascular o que permitiria o influxo de células da imunidade inata, ocasionando liberação de enzimas proteolíticas que degradariam as fibras heterotípicas de colágeno, com exposição de mais COLV e perpetuação da enfermidade ^(140, 179, 180). Nesta hipótese da participação do COLV na etiopatogênese da ES, defendida também por outros autores ^(140, 179, 180), fatores ambientais diferentes como infecções ou substâncias exógenas, poderiam em um indivíduo com *background* genético permissivo, ocasionar dano à membrana basal do endotélio vascular, resultando no aparecimento de um neoantígeno (COLV).

Portanto, acredita-se que o anti COLV não seja um mero espectador ou epifenômeno, mas de fato seja um protagonista no desenvolvimento da ES, primordialmente nas fases iniciais de dano vascular e correlacionado com a atividade da doença, sendo um

bom indicador de necessidade de tratamento naqueles pacientes com positividade para o anticorpo.

Do ponto de vista prático, já havia sido demonstrado que a atividade da doença nos pacientes com ES, pode ser determinada pela realização de biópsias em tecidos acometidos e análise imunohistoquímica para identificação de moléculas de COL V com características morfológicas anômalas ^(39, 179). Adicionalmente, este procedimento cirúrgico pode ser substituído pela análise sorológica, para detectar a presença de anticorpos anti COL V nos soros dos pacientes com ES, já que apresenta correlação com a atividade da doença sistêmica ou órgão específica, facilitando a abordagem terapêutica desta grave enfermidade.

6. CONCLUSÕES

Todos os pacientes com ES avaliados preenchiem os novos critérios do ACR/EULAR para diagnóstico da patologia, eram principalmente do sexo feminino (98,3%) e da forma limitada da doença (43,3%), com idade média de 51 anos, cor branca seguida pela parda, com manifestação inicial de fenômeno de Raynaud antes do diagnóstico, tempo de duração da doença médio de 9 anos e escore cutâneo modificado de Rodnan médio de 13,08. Em relação aos antecedentes pessoais, a maioria declarou não ser tabagista (76,7%) e observou-se *diabetes mellitus* em 15% e câncer em 1,7% dos pacientes com ES.

As principais manifestações clínicas observadas em cada sistema orgânico dos pacientes foram: endurecimento cutâneo nas mãos (78,3%), fenômeno de Raynaud (100%), artrite (33,3%), acometimento de esôfago (71,7%), doença intersticial pulmonar (45%), hipertensão arterial pulmonar (19,4%) e crise renal esclerodérmica (1,7%). As alterações laboratoriais encontradas mais significativamente foram: elevação de provas inflamatórias em 41,7% dos pacientes (VHS e PCR), elevação de CPK (15%), queda dos complementos C3 e C4 (3,3%), anticorpo antinuclear (95%), anti centrômero (41,7%), anticorpo anti DNA topoisomerase I (26,7%), anti RNA polimerase III (11,7%), anti U1 RNP (16,7%) e anti Ro(SSA) em 11,7% dos pacientes.

O anticorpo anti colágeno tipo V (anti COLV) foi detectado em 8,3% dos pacientes com esclerose sistêmica (ES) e se correlacionou apenas com manifestação clínica laboratorial de crise renal esclerodérmica, embora em baixa casuística.

O anti COLV apresentou importante correlação estatisticamente significativa com a atividade da doença; e não se associou com o índice de gravidade da doença, nem com qualquer um dos três anticorpos específicos da ES estudados.

7. REFERÊNCIAS

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 557-67.
2. Herrick AL, Worthington J. Genetic epidemiology Systemic sclerosis. *Arthritis Res* 2002; 4(3): 165-8.
3. Coral-Alvarado P, Pardo AL, Castaño-Rodriguez N, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Systemic sclerosis: A world wide global analysis. *Clin Rheumatol* 2009; 28: 757-65.
4. Beyer C, Schett G, Gay S, Distler O, Distler JHW. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther* 2009; 11:220.
5. Parks CG, Conrad K, Cooper GS. Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease. *Environ Health Perspect* 1999; 107(5): 793–802.
6. Mayes MD. Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin N Am* 2003; 29: 239-54.
7. Kayser C, Andrade LEC. Esclerose sistêmica. In: Sato E. *Guias de medicina ambulatorial e hospitalar - Reumatologia*. São Paulo: Ed. Manole; 2004. p. 111-20.
8. Vilas AP, Veiga MZ, Abecasis P. Esclerose sistêmica – perspectivas atuais. *Med Interna* 2002; 9(2): 111-20.
9. Denton CP, Black CM. Targeted therapy comes of age in scleroderma. *Trends Immunol* 2005; 26(11): 596-602.
10. Allanore Y, Saad M, Dieudé P, Avouac J, Distler JHW, Amouyel P et al. Genome-Wide scan identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis. *PLoS Genet* 2011; 7(7): 1-13.
11. Meda F, Folci M, Baccarelli A, Selmi C. The epigenetics of autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2011; 8(3): 226-36.

12. Briggs D, Welsh KI. Major histocompatibility complex class II genes and systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 862-5.
13. Rees RB, Bennett J. Localized scleroderma in father and daughter. *AMA Arch Derm Syphilol* 1953; 68(3): 360.
14. Arora-Singh RK, Assassi S, Junco DJ, Arnett FC, Perry M, Irfan U et al. Autoimmune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. *J Autoimmun* 2010; 35(1): 52-7.
15. Mayers MD, Trojanowska M. Genetic factors in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(2): S5 (doi: 10.1186/ar2189).
16. Anaya JM, Gómez LM, Castiblanco J. Is there a common genetic basis for autoimmune diseases? *Clin Dev Immunol* 2006, 13(2-4):185-95.
17. Barnett AJ, McNeillage LJ. Antinuclear antibodies in patients with scleroderma (systemic sclerosis) and in their blood relatives and spouses. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 365-8.
18. Romano E, Manetti M, Guiducci S, Ceccarelli C, Allanore Y, Matucci-Cerinic M. The genetics of systemic sclerosis: an update. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29(65): S75-S86.
19. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Updating the genetics of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2010; 22: 665-70.
20. Samano EST, Ribeiro LM, Gorescu RG, Rocha KC, Grumach AS. Involvement of C4 allotypes in the pathogenesis of human disease. *Rev Hosp Clin* 2004; 59(3): 138-44.
21. Granel B, Chevillard C, Dessein A. Facteurs de prédisposition génétiques à la fibrose au cours de la sclérodermie systémique. *La Rev Med Intern* 2005; 26: 294-303.
22. Hudson M, Rojas-Villarraga A, Coral-Alvarado P, López-Guzmán S, Mantilla RD, Chalem P et al. Polyautoimmunity and familial autoimmunity in systemic sclerosis. *J Autoimm* 2008; 31: 156-9.

23. Maddison PJ, Skinner RP, Pereira RS, Black CM, Mansell B, Jayson MIV et al. Antinuclear antibodies in the relatives and spouses of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 793-9.
24. Smith DA, Germolec DR. Introduction to immunology and autoimmunity. *Environ Health Perspect* 1999; 107(5): 661–5.
25. Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* 2009; 9(4): 246-58.
26. Maul GG, Jimenez SA, Riggs E, Ziemnicka-Kotula D. Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: sequence similarity with retroviral p30^{gag} protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad* 1989; 86: 8492-6.
27. Servettaz A, Agard C, Tamby MC, Guilpain P, Guillevin L, Mouthon L. Physiopathologie de la sclérodermie systémique: état des lieux sur une affection aux multiplex facetes. *Presse Med* 2006; 35: 1903-15.
28. Magro CM, Nuovo G, Ferri C, Crowson AN, Giuggioli D, Sebastiani M. Parvoviral infection of endothelial cells and stromal fibroblasts: a possible pathogenetic role in scleroderma. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 43-50.
29. Gavanescu I, Pihan G, Halilovic E, Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM, Doxsey S. Mycoplasma infection induces a scleroderma-like centrosome autoantibody response in mice. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 288-97.
30. Levy Y, Rotman-Pikielny P, Ehrenfeld M, Shoenfeld Y. Silicone breast implantation-induced scleroderma: description of four patients and a critical review of the literature. *Lupus* 2009; 18: 1226-32.
31. Bridges AJ. Autoantibodies in patients with silicone implants. *Semin Arthritis Rheum* 1994; 24(1): 54-60.

32. Tervaert JWC, Kappel RM. Silicone implant incompatibility syndrome (SHS): a frequente cause of ASIA (Shoenfeld's syndrome). *Immunol Res* 2013; 56: 293-8.
33. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. ASIA – autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun* 2011; 36: 4-8.
34. Jimenez AS, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 2004; 140: 37-50.
35. Barcellos KSA, Andrade LEC. Microquimerismo fetal-materno nas doenças reumáticas auto-ímmunes. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(1): 53-61.
36. Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatol* 2009; 48: iii3-iii7.
37. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 1241-54.
38. Rudnicka L, Varga J, Christiano AM, Iozzo RV, Jimenez SA, Uitto J. Elevated expression of type VII collagen in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1994; 93: 1709-15.
39. Oliveira CC, Velosa APP, Parra ER, Capelozzi VL, Teodoro WR, Yoshinari NH. Histomorphometric analysis of cutaneous remodeling in the early stage of the scleroderma model. *Clinics* 2009; 64(6): 577-83.
40. Parra ER, Aguiar Jr AC, Teodoro WR, Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir J* 2009; 3(3): 135-42.
41. Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W et al. Circulating endotelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004, 50(4): 1296-1304.

42. Shiwen X, Leask A, Abraham DJ, Fonseca C. Endothelin receptor selectivity: evidence from in vitro and pre-clinical models of scleroderma. *Eur J Clin Invest* 2009; 39(S2): 19-26.
43. Massabki PS, Lourenço DM, Andrade LEC. Ativação plaquetária na esclerose sistêmica e alternativas metodológicas para sua avaliação. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(1): 62-9.
44. Tokumura A, Carbone LD, Yoshioka Y, Morishige J, Kikuchi M, Postlethwaite A et al. Elevated serum levels of arachidonoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis. *Int J Med Sci* 2009; 6(4): 168-76.
45. Dooley A, Gao B, Shi-Wen X, Abraham DJ, Black CM, Jacobs M et al. Effect of nitric oxide and peroxynitrite on type I collagen synthesis in normal and scleroderma dermal fibroblasts. *Free Radical Biol Med* 2007; 43: 253-64.
46. Servettaz A, Guilpain P, Goulvestre C, Chéreau C, Hercend C, Nicco C et al. Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1202-9.
47. Casciola-Rosen L, Wigley F, Rosen A. Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J Exp Med* 1997; 185(1): 71-9.
48. Mok MY, Fung PCW, Ooi C, Tse HF, Wong Y, Lam YM et al. Serum nitric oxide metabolites and disease activity in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 315-22.
49. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 530-6.
50. Nuytens BP, Thijis T, Deckmyn H, Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thrombosis Res* 2011; 127(2): S26-9.

51. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 2667-76.
52. Classen JF, Henrohn D, Rorsman F, Lennartsson J, Lauwerys BR, Wikström G et al. Lack of evidence of stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptor in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(4): 1137-44.
53. Koch AE, Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther* 2007; 9(2): 1-9.
54. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005; 105(2): 659-69.
55. Azevedo ABC, Sampaio-Barros PD, Torres RM, Moreira C. Avaliação da prevalência de hipertensão pulmonar na esclerose sistêmica. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(1): 31-9.
56. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma): a study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med* 1969; 46(3): 428-40.
57. Ferri C, Di Bello V, Martini A, Giorgi D, Storino FAA, Bianchi M et al. Heart involvement in systemic sclerosis: an ultrasonic tissue characterization study. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 296-302.
58. Schade L, Paiva ES, Müller CS. Envolvimento das musculaturas esquelética e cardíaca na esclerose sistêmica. *Rev Bras Reumatol* 2011; 51(4): 311-3.
59. Hettema ME, Bootsma H, Kallenberg CGM. Macrovascular disease and atherosclerosis in SSc. *Rheumatology* 2008; 47: 578-83.

60. Dart ML, Jankowska-Gan E, Huang G, Roenneburg DA, Keller MR, Torrealba JR et al. IL-17-dependent autoimmunity to collagen type V in atherosclerosis. *Circ Res* 2010; 107(9): 1106-16.
61. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS. Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall. *Collagen Relat Res* 1985; 5(4):355-68.
62. Lafyatis R, York M. Innate immunity and inflammation in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21(6): 617-22.
63. Coelho LFL, Oliveira JG, Kroon EG. Interferons and scleroderma – A new clue to understanding the pathogenesis of scleroderma. *Immunol Letters* 2008; 118: 110-5.
64. Horikawa M, Hasegawa M, Komura K, Hayakawa I, Yanaba K, Matsushita T et al. Abnormal natural killer cell function in systemic sclerosis: altered cytokine production and defective killing activity. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 731-7.
65. Stummvoll GH, Aringer M, Grisar J, Steiner CW, Smolen JS, Knobler R et al. Increased transendothelial migration of scleroderma lymphocytes. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 569-74.
66. Bosello S, De Santis M, Lama G, Spanò C, Angelucci C, Tolusso B et al. B cell depletion in diffuse progressive systemic sclerosis: safety, skin score modification and IL-6 modulation in an up to thirty-six months follow-up open-label trial. *Arthritis Research & Therapy* 2010, 12:R54. <http://arthritis-research.com/content/12/2/R54>.
67. Mouthon L, Peña-Lefebvre PGL, Chanseaud Y, Tamby MC, Boissier MC, Guillemin L. Sclérodermie (1^{re} partie). *Ann Med Interne* 2002; 153(3): 167-78.
68. Trad S, Granel B, Parizot C, Dorgham K, Hanslik T, Marie I et al. Cytokines et différenciation lymphocytaire T au cours de la sclérodermie. *Rev Med Intern* 2011; 32: 472-85.

69. Antiga E, Quaglino P, Bellandi S, Volpi W, Bianco ED, Comessatti A et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. *Brit J Dermatol* 2010; 162: 1056-63.
70. Feghali-Bostwick CA, Wilkes DS. Autoimmunity in idiopathic pulmonary fibrosis. Are circulating autoantibodies pathogenic or epiphenomena? *Am J Resp Crit Care Med* 2011; 183: 692-3.
71. Lee PT, Putman A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* 2002; 110: 793-800.
72. Ueda-Hayakawa I, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Fujimoto M. Circulating γ/δ T cells in systemic sclerosis exhibit activated phenotype and enhance gene expression. Of proalpha2 (I) collagen of fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2013; 69: 54-60.
73. Kunz M, Ibrahim SM. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. *Mediators of Inflammation* 2009; Article ID 979258, 20 pages, 2009. doi:10.1155/2009/979258.
74. Arkfeld DG. The potential utility of B cell-directed biologic therapy in autoimmune diseases. *Rheumatol Int* 2008; 28: 205-15.
75. Kraaij MD, van Laar JM. The role of B cells in systemic sclerosis. *Biologics* 2008; 2(3): 389-95.
76. Asano N, Fujimoto M, Yazawa N, Shirasawa S, Hasegawa M, Okochi H et al. B lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. *Am J Pathol* 2004; 165(2): 641-50.
77. Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, Bouaziz JD, Uchida J, Fujimoto M et al. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am J Pathol* 2006; 169(3): 954-66.

78. Hasegawa M. B lymphocytes: shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010; 37: 3-10.
79. Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Pathogenesis of systemic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *J Dermatol Science* 2005; 39: 1-7.
80. Daoussis D, Liossis ANC, Tsamandas AC, Kalogeropoulou C, Kazantzi A, Sirinian C et al. Experience with rituximab in scleroderma: results from a 1-year, proof-of-principle study. *Rheumatol* 2009; 49(2): 271-80.
81. Lafyatis R, Kissin E, York M, Farina G, Viger K, Fritzler MJ et al. B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(2): 578-83.
82. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Avvedimento EV. Pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 640-5.
83. Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y. Scleroderma – New aspects in pathogenesis and treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2012; 26: 13-24.
84. Geyer M, Müller-Ladner U. The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2011; 40: 92-103.
85. Shi-wen X, Thompson K, Khan K, Liu S, Murphy-Marshmann H, Baron M et al. Focal adhesion kinase and reactive oxygen species contribute to the persistente fibrotic phenotype of lesional scleroderma fibroblastos. *Rheumatology* 2012; 51: 2146-54.
86. Dees C, Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Distler A, Beyer C, Lang V et al. JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth fator β in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(9): 3006-15.

87. Servettaz A, Kavian N, Nicco C, Deveaux V, Chéreau C, Wang A et al. Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. *Amer J Pathol* 2010; 177(1): 187-96.
88. Pannu J, Gardner H, Shearstone JR, Smith E, Trojanowska M. Increased levels of transforming growth factor β receptor type I and up-regulation of matrix gene program. *Arthritis Rheum* 2006; 54(9): 3011-21.
89. Varga J, Pasche B. Transforming growth factor-beta as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5(4): 200-6.
90. Wuttge DM, Wildt M, Geborek P, Wollheim FA, Scheja A, Åkesson A. Serum IL-15 in patients with early systemic sclerosis: a potential novel marker of lung disease. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R85 (doi: 10.1186/ar2284).
91. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum* 2012; 64(11): 3726-35.
92. Hügler T, O'Reilly S, Simpson R, Kraaij MD, Bigley V, Collin M et al. Tumor necrosis factor-costimulated T lymphocytes from patients with systemic sclerosis trigger collagen production in fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2013; 65(2): 481-91.
93. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002; 109: 1453-62.
94. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E et al. CD19 regulates skin and lung fibrosis via toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol* 2008; 172: 1650-63.
95. Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression. In systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(6): 1733-43.

96. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Muroi E et al. Elevated sérum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 194-200.
97. Stegemann A, Sindrilaru A, Eckes B, Rey AD, Heinick A, Schulte JS et al. Tropisetron supresses collagen synthesis in skin fibroblastos via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and attenuates fibrosis in a scleroderma mouse model. *Arthritis Rheum* 2013; 65(3): 792-804.
98. Beyer C, Dess C, Distler JHW. Morphogen pathways as molecular targets for the treatment of fibrosis in systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 2013; 305:1-8.
99. Aida-Yasuoka K, Peoples C, Yasuoka H, Hershberger P, Thiel K, Cauley JA et al. Estradiol promotes the development of a fibrotic phenotype and is increased in the sérum of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15: R10 (doi: <http://arthritis-research.com/content/15/1/R10>).
100. Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermat* 2010; 37: 11-25.
101. Jimenez AS, Hitraya E, Varga J. Pathogenesis of scleroderma: collagen. *Rheum Dis Clin N Amer* 1996; 22(4): 647-74.
102. Moinzadeh P, Denton CP, Abraham D, Ong V, Hunzelmann N, Eckes B et al. Biomarkers for skin involvement and fibrotic activity in scleroderma. *JEADV* 2012; 26: 267-76.
103. Tan A, Denton CP, Mikhailidis DP, Seifalian AM. Recent advances in the diagnosis and treatment of interstitial lung disease in systemic sclerosis (scleroderma): a review. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29(S65): S66-74.
104. Lopes AJ, Capone D, Mogami R, Menezes SLS, Guimarães FS, Levy RA. Pneumonia intersticial associada à esclerose sistêmica: avaliação da função pulmonar no período de cinco anos. *J Bras Pneumol* 2011; 37(2): 144-51.
105. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38: 132-60.

106. Parra ER, Otani LH, Carvalho EF, Ab'Saber A, Capelozzi VL. Systemic sclerosis and idiopathic interstitial pneumonia: histomorphometric differences in lung biopsies. *J Bras Pneumol* 2009; 35(6): 529-40.
107. Andrade LEC, Leser PG. Auto-anticorpos na esclerose sistêmica (ES). *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(3): 215-23.
108. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 80-93.
109. Freire EAM, Ciconelli RM, Sampaio-Barros PD. Análise dos critérios diagnósticos, de classificação, atividade e gravidade de doença na esclerose sistêmica. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(1): 40-5.
110. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K. Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. *Rheum* 2001; 40: 1135-40.
111. Sharp GC, Irvin WS, LaRoque RL, Velez C, Daly V, Kaiser AD et al. Association of autoantibodies to diferente nuclear antigens with clinical patterns of rheumatic disease and responsiveness to therapy. *J Clin Inv* 1971; 50: 350-9.
112. Hamaguchi Y. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol* 2010; 37: 42-53.
113. Saito A, Muro Y, Sugiura K, Ikeno M, Yoda K, Tomita Y. CENP-O, a protein localized at the centromere throughout the cell cycle, is a novel target antigen in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009; 36: 781-6.
114. Volpe A, Ruzzenente O, Caramaschi P, Pieropan S, Tinazzi I, Carletto A et al. Clinical associations of anti-CENP-B and anti-Scl70 antibody levels measured by multiplexed fluorescent microsphere immunoassay in systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2009; 29: 1073-9.

115. Hu PQ, Fertig N, Medsger Jr. T, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1363-73.
116. Hénault J, Robitaille G, Senécal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006; 54(3): 963-73.
117. Hu PQ, Hurwitz AA, Oppenheim JJ. Immunization with DNA topoisomerase I induces autoimmune responses but not scleroderma-like pathologies in mice. *J Rheumatol* 2007; 34: 2243-52.
118. Nikpour M, Hissaria P, Byron J, Sahhar J, Micallef M, Paspaliaris W et al. Prevalence, correlates and clinical usefulness of antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis: a cross-sectional analysis of data from an Australian cohort. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R211 (doi: <http://arthritis-research.com/content/13/6/R211>).
119. Vanthuyne M, Smith V, De Langhe E, Praet JV, Arat S, Depresseux G et al. The Belgian systemic sclerosis cohort: correlations between disease severity scores, cutaneous subsets, and autoantibody profile. *J Rheumatol* 2012; 39: 2127-33.
120. Müller CS, Paiva ES, Azevedo VF, Radominski SC, Lima Filho JHC. Perfil de autoanticorpos e correlação clínica em um grupo de pacientes com esclerose sistêmica na região sul do Brasil. *Rev Bras Reumatol* 2011; 51(4): 319-24.
121. Rasco RG, Palma MJC, Hernández FJG, Román JS. Coexistencia de anticuerpos anti-topoisomerase I y anticentrômero em la esclerodermia. *Med Clín (Barc.)* 2010; 135: 430-1.
122. Dick T, Mierau R, Bartz-Bazzanella P, Alavi M, Stoyanova-Scholz M, Kindler J et al. Coexistence of anti-topoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 121-7.

123. Pereira AM, Bodas A, Barbosa J, Bernardes M, Delgado L. Avaliação da IgG anti-peptídeo citrulinado cíclico (CCP) em doentes com artrite reumatóide, outras doenças difusas do tecido conjuntivo e controles saudáveis. *Arq Med* 2006; 20(1-2): 13-8.
124. Lima I, Barbosa L, Lopes M, Reis E, Reis M, Colossi K et al. Pesquisa de anticorpos antinucleossoma em lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2007; 47(3): 160-4.
125. Sato S, Koder M, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Antinucleosome antibody is a major autoantibody in localized scleroderma. *Brit J Dermatol* 2004; 151: 1182-8.
126. Ooka S, Matsui T, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to low-density-lipoprotein-receptor-related protein 2 (LRP2) in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: R174-80.
127. Meliconi R, Bestagno M, Sturani C, Negri C, Galavotti V, Sala C et al. Autoantibodies to DNA topoisomerase II in cryptogenic fibrosing alveolitis and connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 184-9.
128. Salojin KV, Tonquèze ML, Saraux A, Nassonov EL, Dueymes M, Piette JC et al. Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med* 1997; 102: 178-85.
129. Habeeb RA, Mansour HE, Abdeldayem AM, Abo-shady RA, Hassan IA, Saafan NK et al. Anti-annexin V antibodies: association with vascular involvement and disease outcome in patients with systemic sclerosis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 2010; 3: 15–23.
130. Fujimoto M, Hamaguchi Y, Yazawa N, Komura K, Takehara K, Sato S. Autoantibodies to a collagen-specific molecular chaperone, heat-shock protein 47, in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 534-9.
131. Fineschi S, Cozzi F, Burger D, Dayer JM, Meroni PL, Chizzolini C. Anti-fibroblast antibodies detected by cell-based ELISA in systemic sclerosis enhance the collagenolytic

activity and matrix metalloproteinase-1 production in dermal fibroblasts. *Rheumatology* 2007; 46: 1779-85.

132. Riente L, Marchini B, Dolcher MP, Puccetti A, Bombardieri S, Migliorini P. Anti-collagen antibodies in systemic sclerosis and in primary Raynaud's phenomenon. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 354-9.

133. Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010; 37: 26-41.

134. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends in Immunology* 2005; 26(11): 587-95.

135. Pablos JL, Everett ET, Norris JS. The tight skin mouse: an animal model of systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(33): S81-S85.

136. Phelps RG, Murai C, Saito S, Hatakeyama A, Andrikopoulos K, Kasturi KN et al. Effect of targeted mutation in collagen V $\alpha 2$ gene on development of cutaneous hyperplasia in tight skin mice. *Molec Med* 1998; 4: 356-60.

137. Gentiletti J, McCloskey LJ, Artlett CM, Peters J, Jimenez AS, Christner PJ. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol* 2005; 175: 2418-26.

138. Yoshinari NH, Teodoro WR, Ogido LTI, Velosa APP, Prizon CC, Miron B et al. Modelo experimental de doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) induzido por colágeno do tipo V. *Rev Bras Reumatol* 2002; 42(5): 295-305.

139. Callado MRM, Viana VST, Vendramini MBG, Leon EP, Bueno C, Velosa APP et al. Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology* 2007; 122: 38-46.

140. Oliveira CC, Teodoro WR, Velosa APP, Yoshinari NH. Auto-imunidade e colágeno V. *Rev Bras Reumatol* 2006; 46(3): 194-8.

141. Julião GPS, Pereira DD, Anjos DM, Teodoro WR, Yoshinari NH, Velosa APP. Alterações esofágicas em modelo de esclerodermia induzido por colágeno V em coelhos. *Rev Med (São Paulo)* 2007; 86(3): 163-73.
142. Garippo A, Parra E, Teodoro W, Rivero D, Souza F, Yoshinari N et al. Nasal tolerance with collagen V protein reverts bronchovascular axis remodeling in experimental bronchiolitis obliterans. *Clinics* 2007; 62(4): 499-506.
143. Velosa APP, Teodoro WR, Anjos DM, Konno R, Oliveira CC, Katayama MLH et al. Collagen V-induced nasal tolerance downregulates pulmonary collagen mRNA gene and TGF-beta expression in experimental systemic sclerosis. *Respir Res* 2010; 11: 1 (doi:10.1186/1465-9921-11-1).
144. Hubmacher D, Apte SS. The biology of the extracellular matrix: novel insights. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25(1): 65-70.
145. Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. *Micron* 2001; 32: 251-60.
146. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectina, integrins, and minor colagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(5-24): 495-501.
147. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 2001; 33: 7-21.
148. Orgel JPRO, Antipova O, Sagi I, Bitler A, Qiu D, Wang R et al. Collagen fibril surfasse displays a constellation of sites capable of promoting fibril assembly, stability, and hemostasis. *Connect Tissue Res* 2011; 52(1): 18-24.
149. Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K, Arima M. Localization of type V Collagen and Type IV Collagen in Human Cornea, Lung, and Skin. *Am J Pathol* 1984; 116(3): 417-26.

150. Sumiyoshi H, Kitamura H, Matsuo N, Tatsukawa S, Ishikawa K, Okamoto O et al. Transient expression. Of mouse Pro- α 3(V) collagen gene (Col5a3) in wound healing. *Connect Tissue Research* 2012; 53(4): 313-7.
151. Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem* 2012; 52: 113-33.
152. Nicholls AC, Oliver JE, McCarron S, Harrison JB, Greenspan DS, Pope FM. An exon skipping mutation of a type V collagen gene (COL5A1) in Ehlers-Danlos syndrome. *J Med Genet* 1996; 33: 940-6.
153. Chanut-Delalande H, Bonod-Bidaud C, Cogne S, Malbouyres M, Ramirez F, Fichard A et al. Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. *Mol Cell Biol* 2004; 24(13): 6049-57.
154. Paepe AD, Nuytinck L, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Naeyaert JM. Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 547-54.
155. Symoens S, Malfait F, Vlummens P, Hermanns-Lê T, Syx D, Paepe AD. A novel splice variant in the N-propeptide of COL5A1 causes an EDS phenotype with severe kyphoscoliosis and eye involvement. *PLoS ONE* 2011; 6(5): e20121. Doi: 10.1371/journal.pone.0020121.
156. Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler LI et al. Type V Collagen: Molecular structure and fibrillar organization of the chicken α 1(V) NH₂-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol* 1993; 121(5): 1181-9.
157. Marchant JK, Hahn RA, Linsenmayer TF, Birk DE. Reduction of type V collagen using a dominant-negative strategy alters the regulation of fibrillogenesis and results in the loss of corneal-specific fibril morphology. *J Cell Biol* 1996; 135(5): 1415-26.
158. Spiess K, Teodoro WR, Zorn TMT. Distribution of collagen types I, III, and IV in pregnant mouse endometrium. *Connective Tissue Research* 2007; 48(2): 99-108.

159. Iwahashi M, Nakano R. Decreased type V collagen expression. in human decidual tissues of spontaneous abortion during early pregnancy. *J Clin Pathol* 1998; 51: 44-6.
160. Iwahashi M, Ooshima A, Nakano R. Increase in the relative level of type V collagen during development and ageing of the placenta. *J Clin Pathol* 1996; 49: 916-19.
161. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 2001; 32: 223-37.
162. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol* 1988; 106: 999-1008.
163. Mizuno K, Adachi E, Imamura Y, Katsumata O, Hayashi T. The fibril structure of type V collagen triple-helical domain. *Micron* 2001; 32: 317-23.
164. Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Research* 2003; 36: 1037-46.
165. Dawson DG, Watsky MA, Geroski DH, Edelhauser HF. Cornea and sclera. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. *Duane's ophthalmology* [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. Chapter 4.
166. Peng W, Yan J, Wan Y, Wang B, Tao J, Yang G et al. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. *J Clin Immunol* 2012; 32: 1409-14.
167. Louneva N, Huaman G, Fertala J, Jiménez AS. Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression. By simvastatin. *Arthritis Rheum* 2006; 54(4): 1298-1308.
168. Dees C, Tomcik M, Zerr P, Akhmetshina A, Horn A, Palumbo K et al. Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 1304-10.

169. Montagnana M, Volpe A, Lippi G, Caramaschi P, Salvagno GL, Biasi D et al. Relationship between matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of matrix metalloproteinases systems and autoantibody patterns in systemic sclerosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 837-42.
170. Moinzadeh P, Krieg T, Hellmich M, Brinckmann J, Neumann E, Müller-Ladner U et al. Elevated MMP-7 levels in patients with systemic sclerosis: correlation with pulmonary involvement. *Exp Dermatol* 2011; 20: 770-3.
171. Tomimura S, Ogawa F, Iwata Y, Komura K, Hara T, Muroi E et al. Autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with localized scleroderma. *J Dermatol Sci* 2008; 52: 47-54.
172. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 542-7.
173. Gay S, Miller EJ. Overview: what is collagen, what is not. *Infor Helth* 1983; 4(4): 365-77.
174. Gay S, Rhodes RK, Gay RE, Miller EJ. Collagen molecules comprised of $\alpha_1(V)$ -chains (B-chains): an apparent localization in the extracellular skeleton. *Collagen Relat Research* 1980; 1(1): 53-8.
175. Gay S, Martinez-Hernandez A, Rhodes RK, Miller EJ. The collagenous extracellular skeleton of smooth muscle cells. *Collagen Relat Research* 1981; 1(4): 377-84.
176. Michaeli D, Fudenberg HH. The incidence and antigenic specificity of antibodies against denatured human collagen in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1974; 2(2):153-9.
177. Black CM, Duance VC, Sims TJ, Light ND. An investigation of the biochemical and histological changes in the collagen of the kidney and skeletal muscle in systemic sclerosis. *Collagen Rel Research* 1983; 3(3): 231-43.

178. Moreland LW, Gay RE, Gay S. Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and systemic lúpus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 60(3): 412-8.
179. Martin P, Teodoro WR, Velosa APP, Morais J, Carrasco S, Christmann R et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimm Rev* 2012; 11(11): 827-35.
180. Yoshida S, Haque A, Mizobuchi T, Iwata T, Chiyo M, Webb TJ et al. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed lung transplants. *Amer J Transplant* 2006; 6: 724-35.
181. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, Haynes LD, Xu Q, Bobadilla JL et al. IL-17 dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest* 2007; 117(11): 3498-506.
182. Bobadilla JL, Love RB, Jankowska-Gan E, Xu Q, Haynes LD, Braun RK et al. Th-17, monokines, collagen type V, and primary graft dysfunction in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 660-8.
183. Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zheng Y et al. Evidence for imune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol* 2002; 169(3): 1542-9.
184. Iwata T, Philipovski A, Fisher AJ, Presson Jr RG, Chiyo M, Lee J et al. Anti-type V collagen humoral immunity in lung transplant primary graft dysfunction. *J Immunol* 2008; 181(8): 5738-47.
185. Braun RK, Molitor-Dart M, Wigfield C, Xiang Z, Fain SB, Jankowska-Gan E et al. Transfer of tolerance to collagen type V suppresses Th-17 lymphocyte mediated acute lung transplant rejection. *Transplantation* 2009; 88(12): 1341-8.

186. Vittal R, Mickler EA, Fisher AJ, Zhang C, Rothhaar K, Gu H et al. Type V collagen induced tolerance suppresses collagen deposition, TGF- β and associated transcripts in pulmonar fibrosis. PLoS ONE 2013; 8(10): e76451. Doi:10.1371/journal.pone.0076451
187. Tiriveedhi V, Angaswamy N, Brand D, Weber J, Gelman AG, Hachem R et al. A shift in the collagen V antigenic epitope leads to T helper phenotype switch and imune response to self-antigen leading to chronic lung allograft rejection. Clin Exp Immunol 2011; 167: 158-68.
188. Yamada Y, Sekine Y, Yoshida S, Yasufuku K, Petrache I, Benson H et al. Type V collagen-induced oral tolerance plus low-dose cyclosporine prevents rejection of MHC class I and II incompatible lung allografts. J Immunol 2009; 183(1): 237-45.
189. Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH. Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured colagens by cultured human alveolar macrophages. J Clin Invest 1987; 80: 1644-50.
190. Parra ER, Bielecki LC, Ribeiro JMFP, Balsalobre FA, Teodoro WR, Capelozzi VL. Association between decreases in type V collagen and apoptosis in mouse lung chemical carcinogenesis: a preliminar model to study câncer cell behavior. Clinics 2010; 65(4):425-32.
191. Esposito I, Born D, Bergmann F, Longerich T, Welsch T, Giese NA et al. Autoimmune pancreatocholangitis, non-autoimmune pancreatitis and primary sclerosing cholangitis: a comparative morphological and immunological analysis. PLoS ONE 2008; 3(7): e2539. Doi:10.1371/journal.pone.0002539.
192. Vassiliadis E, Veidal SS, Simonsen H, Larsen DV, Vainer B, Chen X et al. Immunological detection of tuetype V collagen propeptide fragmente, PVCP-1230, in connective tissue remodeling associated with liver fibrosis. Reser Articles 2011; 16(5): 426-33.
193. Bednarczuk T, Stolarski C, Pawlik E, Slon M, Rowinski M, Kubota S et al. Autoantibodies reactive with extracelular matrix proteins in patients with thyroid-associated ophthalmopathy. Thyroid 1999; 9(3): 289-95.

194. Bezerra MC. Remodelamento da pele semelhante à esclerodermia induzido pelo colágeno tipo V [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
195. Marangoni RG. Estudo da vasculopatia pulmonar no modelo experimental de esclerodermia induzido pelo colágeno do tipo V [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.
196. Mato Grosso do Sul – Campo Grande – Infográficos: dados gerais do município, 2010. (doi. <http://cod.ibge.gov.br/G58>).
197. Furst DE, Fernandes AW, Iorga SR, Greth W, Bancroft T. Epidemiology of systemic sclerosis in a large US managed care population. *J Rheumatol* 2012; 39: 784-6.
198. Allcock RJ, Forrest I, Corris PA, Crook PR, Griffiths ID. A study of the prevalence of systemic sclerosis in northeast England. *Rheumatology* 2004; 43: 596-602.
199. Masi AT, Rodnan GP, Medsger Jr, TA et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23: 581-90.
200. 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. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1747-55.
201. LeRoy EC, Medsger Jr. TA. Criteria for the Classification of Early Systemic Sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28(7):1573-6.
202. Sampaio-Barros PD, Samara AM, Marques Neto JF. Estudo sobre as diferentes formas clínicas e escores cutâneos na esclerose sistêmica. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(1): 01-8.
203. Medsger Jr TA. Natural history of systemic sclerosis and the assessment of disease activity, severity, functional status, and psychologic well-being. *Rheum Dis Clin N Am* 2003; 29: 255-73.

204. Medsger Jr TA, Bombardieri S, Czirjak L, Scorza R, Della Rossa A, Bencivelli W. Assessment of disease severity and prognosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21(S29): S42-6.
205. Valentini G, D'Angelo S, Rossa AD, Bencivelli W, Bombardieri S. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. IV. Assessment of skin thickening by modified Rodnan skin score. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 904-5.
206. Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminar activity indexes. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 592-8.
207. Valentini G, Silman AJ, Veale D. Assessment of disease activity. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21(S29): S39-41.
208. Valentini G, Bencivelli W, Bombardieri S, D'Angelo S, Della Rossa A, Silman AJ et al. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminar activity criteria. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 901-3.
209. Della Rossa A, Valentini G, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. I. Clinical and epidemiological features of 290 patients from 19 centres. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 585-91.
210. Bruce B, Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: Dimensions and Practical Applications. *Health Quality Life Outcomes* 2003; 1:20-6.
211. Johnson SR, Hawker GA, Davis AM. The health assessment questionnaire disability index and scleroderma health assessment questionnaire in scleroderma trials: an evaluation of their measurement properties. *Arthritis Rheum* 2005; 53(2): 256-62.

212. Rannou F, Poiraudau S, Berezné A, Baubet T, Le-Guern V, Cabane J et al. Assessing disability and quality of life in systemic sclerosis: construct validities of the Cochin hand function scale, health assessment questionnaire (HAQ), systemic sclerosis HAQ, and medical outcomes study 36-item short form health survey. *Arthritis Rheum* 2007; 57(1): 94-102.
213. Dellavance A, Gabriel Jr. A, Cintra AFU et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em células Hep-2. *Rev Bras Reumatol* 2003; 43(3): 129-40.
214. Aarden A, De Groot ER, Feltkamp TEW. Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 254: 505-15.
215. McClain MT, Ramsland PA, Kaufman KM et al. Anti-Sm autoantibodies in systemic lupus target highly basic surface structures of complexed spliceosomal autoantigens. *J Immunol* 2002; 168: 2054-62.
216. Hildebrandt S, Weiner ES, Senecal JL, Noell GS, Earnshaw WC, Rothfielda NF. Autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70): Analysis by gel diffusion, immunoblot, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunop*, 1990; 57(3): 399–410.
217. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA et al. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 1-6.
218. Codullo V, Morozzi G, Bardoni A, Salvini R, Deleonardi G, Pità O et al. Validation of a new immunoenzymatic method to detect antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 373-7.
219. Skare TL, Luciano AC, Fonseca AE, Azevedo PM. Autoanticorpos em esclerodermia e sua associação ao perfil clínico da doença. Estudo em 66 pacientes do sul do Brasil. *An Bras Dermatol* 2011; 86(6): 1075-81.
220. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M et al. The registry of the German network for systemic scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology* 2008; 47: 1185-92.

221. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1012 Italian patients. *Medicine* 2002; 81(2): 139-53.
222. Sampaio-Barros PD, Bortoluzzo AB, Marangoni RG, Rocha LF, Del Rio APT, Samara AM et al. Survival, causes of death, and prognostic factors in systemic sclerosis: analysis of 947 Brazilian patients. *J Rheumatol* 2012; 39: 1971-8.
223. Guidolim F, Esmanhotto L, Magro CE, Silva MB, Skare TL. Prevalência de achados cutâneos em portadores de esclerose sistêmica – Experiência de um hospital universitário. *An Bras Dermatol* 2005; 80(5): 481-6.
224. Rosa JE, Soriano ER, Narvaez-Ponce L, del Cid CC, Imamura PM, Catoggio LJ. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in a healthcare plan in Buenos Aires. *J Clin Rheumatol* 2011; 17(2): 59-63.
225. Ríos G, Mayor AM. Clinical and sociodemographic features of Puerto Ricans with systemic sclerosis. *Ethn Dis* 2010; 20(S1): S185-9.
226. Flower C, Nwankwo C. systemic sclerosis in an Afro-Caribbean population. A review of demographic and clinical features. *West Indian Med J* 2008; 57(2): 118-21.
227. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24: 165-70.
228. Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003; 48(8): 2246-55.
229. Bassel M, Hudson M, Taillefer SS, Schieir O, Baron M, Thombs BD. Frequency and impact of symptoms experienced by patients with systemic sclerosis: results from a Canadian National Survey. *Rheumatology* 2011; 50: 762-7.

230. Kuo CF, See LC, Yu KH, Chou IJ, Tseng WY, Chang HC et al. Epidemiology and mortality of systemic sclerosis: a Nationwide population study in Taiwan. *Scan J Rheumatol* 2011; 40(5): 373-8.
231. Tamaki T, Mori S, Takehara K. Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo. *Arch Dermatol Res* 1991; 283(6): 366-71.
232. Al-Adhath RN, Al-Sayed TA. Clinical features of systemic sclerosis. *Saudi Med J* 2001; 22(4): 333-6.
233. Lo Monaco A, Bruschi M, La Corte R, Volpinari S, Trotta F. Epidemiology of systemic sclerosis in a district of northern Italy. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29(S65): S10-4.
234. Le Guern V, Mahr A, Mouthon L, Jeanneret D, Carzon M, Guillevin L. Prevalence of systemic sclerosis in a French multi-ethnic county. *Rheumatology* 2004; 43: 1129-37.
235. Nietert PJ, Mitchell HC, Bolster MB, Shaftman SR, Tilley BC, Silver RM. Racial variation in clinical and immunological manifestations of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2006; 33: 263-8.
236. Jezler SFO, Santiago MB, Andrade TL, Araujo Neto C, Braga H, Cruz AA. Comprometimento do interstício pulmonar em portadores de esclerose sistêmica progressiva. Estudo de uma série de 58 casos. *J Bras Pneumol* 2005; 31(4): 300-6.
237. Merkel PA, Herlyn K, Martin RW et al. Measuring disease activity and functional status in patients with scleroderma and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 2002; 46 (9): 2410-20.
238. Chiffhot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 37: 223-35.
239. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton CP, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O et al. Geographical variation of disease manifestations in systemic sclerosis: a report from the

EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) group database. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 856-62.

240. Minier T, Nagy Z, Bálint Z, Farkas H, Radics J, Kumánovics G et al. Construct validity evaluation of the European Scleroderma Study Group activity index, and investigation of possible new disease activity markers in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2010; 49: 1133-45.

241. Morita Y, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y, Tamakoshi K. Results of the Health Assessment Questionnaire for Japanese patients with systemic sclerosis – measuring functional impairment in systemic sclerosis versus other connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 367-72.

242. Geirsson ÁJ, Wollheim FA, Åkesson A. Disease severity of 100 patients with systemic sclerosis over a period of 14 years: using a modified Medsger scale. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 1117-22.

243. Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, Restelli VG, Rohde LEP, Pinotti AFF et al. Nailfold capillary microscopy can suggest pulmonar disease activity in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004; 31: 286-94.

244. Schmeiser T, Pons-Kühnemann J, Özden F, Müller-Ladner U, Dinser R. Arthritis in patients with systemic sclerosis. *Eur J Intern Med* 2012; 23(1): 25-9.

245. Szücs G, Szekanecz Z, Zilahi E, Kapitány A, Baráth S, Szamosi S et al. Systemic sclerosis-rheumatoid arthritis Overlap syndrome: a unique combination of features suggests a distinct genetic, serological and clinical entity. *Rheumatology* 2007; 46: 989-93.

246. Calderaro DC, de Carvalho MA, Moretzsohn LD. Esophageal manometry in 28 systemic sclerosis Brazilian patients: findings and correlations. *Dis Esophagus* 2009; 22(8): 700-4.

247. Cardoso JM, Lima PL, Ribeiro CEO, Bonomi D, Lima MJR, Lacerda-Filho A. Semi-obstrução intestinal por esclerodermia – relato de caso. *Rev Bras Colo-Proctol* 2006; 26(2): 187-92.

248. Baptista APW, Barreto M. Manifestações gastrointestinais das colagenoses. *Rev Bras Med* 2005; 5: 100-6.
249. Grosso O, Saad AK, Volberg VI, Bresan E, Laborde H, Berensztejn CS et al. El ecocardiograma em la esclerodermia. *Insuf Card* 2011; 6(3): 106-11.
250. Azevedo ABC, Sampaio-Barros PD, Torres RM, Moreira C. Avaliação da prevalência de Hipertensão Pulmonar na Esclerose Sistêmica. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(1): 31-9.
251. Santos MK, Faria FB, Trad CS. Comprometimento pulmonar na esclerose sistêmica: revisão de casos. *Radiol Bras* 2006; 39(3): 181-4.
252. Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2006; 73: 490-4.
253. Azevedo ABC, Guimarães SMM, Tavares Jr WC, Calderaro D, Leão Filho HM, Ferreira CS et al. Avaliação da tomografia de alta resolução versus radiografia de tórax na doença intersticial pulmonar na esclerose sistêmica. *Radiol Bras* 2005; 38(2): 95-9.
254. Olesen AB, Svaerke C, Farkas DK, Sørensen HT. Systemic sclerosis and the risk of câncer: a Nationwide population-based cohort study. *Br J Dermatol* 2010; 163(4): 800-6.
255. Onishi A, Sugiyama D, Kumagai S, Morinobu A. Cancer incidence in systemic sclerosis: meta-analysis of population-based cohort studies. *Arthritis Rheum* 2013; 65(7): 1913-21.
256. Bonifazi M, Tramacere I, Pomponio G, Gabrielli B, Avvedimento EV, La Vecchia C et al. Systemic sclerosis (scleroderma) and câncer risk: systematic review and meta-analysis of observacional studies. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(1): 143-54.
257. Machado RIL, Braz AS, Freire EAM. Incidência de neoplasias nas doenças reumatológicas autoimunes mais prevalentes: uma revisão sistemática. *Rev Bras Reumatol* 2014; 54(2): 131-9.

258. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Åkesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2003; 42: 534-40.
259. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German network for systemic scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R172 (doi. <http://arthritis-research.com/content/13/5/R172>).
260. Bernstein RM, Steigerwald JC, Tan EM. Association of antinuclear and antinucleolar antibodies in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1982; 48: 43-51.
261. Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Sato S et al. Distribution and antigen specificity of anti-U1RNP antibodies in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 383-7.
262. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35(1): 35-42.
263. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. The prevalence and clinical significance of anti-U1 RNA antibodies in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2003; 120(2): 204-10.
264. Avouac J, Sordet C, Depinay C, Ardizzone M, Vacher-Lavenu MC, Sibilia J et al. Systemic sclerosis-associated Sjögren's Syndrome and relationship to the limited cutaneous subtype. *Arthritis Rheum* 2006; 54(7): 2243-9.
265. Salliot C, Mouthon L, Ardizzone M, Sibilia J, Guillemin L, Gottenberg JE et al. Sjögren's syndrome is associated with and not secondary to systemic sclerosis. *Rheumatology* 2007; 46: 321-6.
266. Drosos AA, Andonopoulos AP, Costopoulos JS, Stavropoulos ED, Papadimitriou CS, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome in progressive systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1988; 15(6): 965-8.

267. Baldini C, Mosca M, Della Rossa A, Pepe P, Notarstefano C, Ferro F et al. Overlap of ACA-positive systemic sclerosis and Sjögren's syndrome: a distinct clinical entity with mild organ involvement but a high risk of lymphoma. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31(2): 272-80.
268. Muangchan C, Harding S, Khimdas S, Bonner A, Baron M, Pope J. Association of C-Reactive Protein with high disease activity in systemic sclerosis: results from the Canadian Scleroderma Research Group. *Arthritis Care Res* 2012; 64(9): 1405-14.
269. McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21 (S29): S32-8.
270. Doran JP, Veale DJ. Biomarkers in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008; 47: 36-8.
271. Chen M, Daha MR, Kallenberg CGM. The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimm* 2010; 34(3): 276-86.
272. Cuomo G, Abignano G, Ruocco L, Vettori S, Valentini G. L'ipocomplementemia nella sclerosi sistemica. *Reumatismo* 2008; 60(4): 268-73.
273. Arason GJ, Geirsson AJ, Kolka R, Vikingsdóttir T, Valdimarsson H. Deficiency of complement-dependent prevention of immune precipitation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 257-60.
274. Senaldi G, Lupoli S, Vergani D, Black CM. Activation of the complement system in systemic sclerosis. Relationship to clinical severity. *Arthritis Rheum* 1989; 32(10): 1262-7.
275. Batal I, Domsic RT, Medsger Jr TA, Bastacky S. Scleroderma renal crisis: a pathology perspective. *Int J Rheumatol* 2010; (doi: 10.1155/2010/543704).
276. Batal I, Domsic RT, Shafer A, Medsger Jr TA, Kiss LP, Randhawa P et al. Renal biopsy findings predicting outcome in scleroderma renal crisis. *Human Pathol* 2009; 40(3): 332-40.

277. Lopes MRU, Mantovani E, Dinis VG, Bonoldi VL, Ribeiro ACM, Yoshinari NH et al. Evidência de anticorpos anti-colágeno tipo V nas formas iniciais de esclerose sistêmica em humanos. *Rev Bras Reumatol* 2013; 53(S1): 212.
278. Marangoni RG, Parra ER, Barbeiro HV, Velosa APP, Soriano VG, Teodoro WR et al. Experimental model of systemic sclerosis induced by collagen V reproduces extra and intrapulmonary artery dysfunction (Abstract). *Clin Exp Rheumatol* 2010; 5(62): 31 Suppl.
279. Black CM, McWhirter A, Harrison NK, Kirk JME, Laurent GJ. Serum type III procollagen peptide concentrations in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon: relationship to disease activity and duration. *Brit J Rheumatol* 1989; 28: 98-103.
280. Appenzeller S, Sampaio-Barros PD, Samara AM, Marques Neto JF. Crise renal como manifestação inicial de Esclerose Sistêmica Sine Scleroderma. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(1): 87-9.
281. Mouthon L, Mehrenberger M, Teixeira L, Fakhouri F, Bérezné A, Guillevin L et al. Endothelin-1 expression in scleroderma renal crisis. *Hum Pathol* 2011; 42(1): 95-102.
282. Georges C, Chassany O, Mouthon L, Tiev K, Toledano C, Meyer O et al. Validation of French version of the Scleroderma Health Assessment Questionnaire (SSc HAQ). *Clin Rheumatol* 2005; 24: 3-10.
283. Xinyi NG, Thumboo J, Low AHL. Validation of the scleroderma health assessment questionnaire and quality of life in English and Chinese-speaking patients with systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis* 2012; 15: 268-76.
284. Andrade TL, Camelier AA, Rosa FW, Santos MP, Jezler S, Silva JLP. Aplicabilidade do questionário de qualidade de vida relacionada à saúde – the 12-Item Short-Form Health Survey – em pacientes portadores de esclerose sistêmica progressiva. *J Bras Pneumol* 2007; 33(4): 414-22.
285. Pope J. Measures of systemic sclerosis (Scleroderma). *Arthritis Care Res* 2011; 63(S11): S98-111.

286. Iudici M, Cuomo G, Vettori S, Avellino M, Valentini G. Quality of life as measured by the short-form 36 (SF-36) questionnaire in patients with early systemic sclerosis and undifferentiated connective tissue disease. *Health Qual Life Out* 2013; 11: 23 (doi: <http://www.hqlo.com/content/11/1/23>).
287. Danieli E, Airò P, Bettoni L, Cinquini M, Antonioli CM, Cavazzana I et al. Health-related quality of life measured by the Short Form 36 (SF-36) in systemic sclerosis: correlations with indexes of disease activity and severity, disability, and depressive symptoms. *Clin Rheumatol* 2005; 24: 48-54.
288. Medsger Jr TA. Assessment of damage and activity in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 545-8.
289. Fan X, Pope J. What is the relationship between disease activity, severity and damage in a large Canadian systemic sclerosis cohort? Results from the Canadian Scleroderma Research Group (CSRG). *Rheumatol Int* 2010; 30: 1205-10.
290. Walker JG, Steele RJ, Schnitzer M, Taillefer S, Baron M, Hudson M. The association between disease activity and duration in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2010; 37: 2299-306.
291. Hudson M, Steele R, Baron M. Update on indices of disease activity in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2007; 37: 93-8.
292. Schioppo T, Artusi C, Ciavarella T, Ingegnoli F, Murgio A, Zeni S et al. N-TproBNP as Biomarker in systemic sclerosis. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2012; 43: 292-301.
293. Hummers LK. The current state of biomarkers in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12(1): 34-9.
294. Castro SV, Jimenez AS. Biomarkers in systemic sclerosis. *Biomarkers Med* 2010; 4(1): 133-47.

295. Denton CP, Lapadula G, Mouthon L, Müller-Ladner U. Renal complications and scleroderma renal crisis. *Rheumatology* 2009; 48(3): iii32-iii35. (doi: 10.1093/rheumatology/ken483).
296. Neudecker BA, Stern R, Connolly MK. Aberrant serum hyaluronan and hyaluronidase levels in scleroderma. *Brit J Dermatol* 2004; 150: 469-76.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CARTA DE INFORMAÇÃO

Meu nome é Dr Alex Magno Coelho Horimoto, fiz Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e estou fazendo uma pesquisa clínico-epidemiológica.

Convido o (a) senhor (a) para participar desta pesquisa que tem o título de: “ANTICORPO ANTI COLÁGENO TIPO V EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA: CORRELAÇÃO COM OUTROS AUTOANTICORPOS ESPECÍFICOS, COM OS CRITÉRIOS DE GRAVIDADE E DE ATIVIDADE DA DOENÇA”.

Os participantes serão pacientes de qualquer idade, com diagnóstico de esclerose sistêmica, forma limitada ou difusa, preferencialmente que fazem acompanhamento e tratamento da doença no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, ou em outros ambulatorios do qual faço parte, durante o período de Abril de 2012 a Dezembro de 2013.

Estou pesquisando para conhecer melhor sobre as manifestações clínicas e laboratoriais da esclerose sistêmica, com ênfase nas manifestações clínicas e laboratoriais, contribuindo para o diagnóstico precoce e melhoria da qualidade do atendimento aos pacientes.

Sua participação consiste em comparecer ao ambulatório/consultório/hospital para consulta clínica, em data e horário que serão marcados, permitir avaliação clínica com coleta de material para exames de sangue e responder às perguntas do pesquisador para preenchimento de questionário.

Informo ainda que:

- O (a) senhor (a) tem direito de não participar desta pesquisa, se assim o desejar, sem prejuízo do seu tratamento.
- Os benefícios a serem esperados serão de melhor reconhecimento da sua doença e tratamento mais precoce em outros pacientes.
- Caso aceite participar, garanto o anonimato e segredo quanto ao seu nome e informações prestadas durante a entrevista. Não divulgarei seu nome nem qualquer informação que possa identificá-lo ou que estejam relacionadas à sua intimidade.

_____ Data ____/____/____
Assinatura do paciente

_____ Data ____/____/____
Assinatura de testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação neste estudo

_____ Data ____/____/____
Assinatura do pesquisador

- Garanto que não haverá qualquer prejuízo ou alteração do seu tratamento por causa das informações que serão fornecidas pelo senhor (a).
- Durante qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Dr. Alex Magno Horimoto, pertencente à disciplina de Reumatologia do Hospital Universitário que pode ser encontrado na Disciplina de Reumatologia à Av Filinto Muller Snº (Fone: 3345-3231). Havendo qualquer dúvida quanto à ética desta pesquisa, os pacientes deverão se dirigir ao Comitê de ética em Pesquisa da UFMS, situado no Campus de Pró Reitoria da UFMS, primeiro andar, (fone: 3345-7187).
- Todos os materiais e técnicas utilizados para a coleta de exames são seguros e esterilizados, não representando risco à sua saúde. Os riscos e desconfortos se relacionam com a coleta de sangue, sendo que poderá ocorrer ou não dor durante a coleta e formação de hematoma no local da punção. Não são esperados outros riscos com a sua participação.
- Mesmo tendo aceitado participar, se por qualquer motivo resolver desistir, mesmo durante o andamento da pesquisa, tem toda a liberdade para retirar seu consentimento.
- Este Termo de Consentimento será feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder do senhor (a), e a outra cópia será arquivada por período de 5 anos.

Espero poder contar com sua colaboração, a qual desde já agradeço.

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu _____ concordo em participar do estudo chamado: “ANTICORPO ANTI COLÁGENO TIPO V EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA: CORRELAÇÃO COM OUTROS AUTOANTICORPOS ESPECÍFICOS, COM OS CRITÉRIOS DE GRAVIDADE E DE ATIVIDADE DA DOENÇA”. Autorizo a utilização dos dados coletados para a realização do estudo. Tenho conhecimento do seu caráter científico, dos objetivos, método de coleta de dados (entrevista, exame clínico e laboratorial, preenchimento de questionário) e condições de segurança, sendo minha participação estritamente voluntária. Estou ciente de que as informações serão tratadas de forma anônima e sigilosa e de que não sofrerei nenhum tipo de

sansão ou prejuízo, caso me recuse a participar.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do paciente

_____ Data ____/____/____

Assinatura de testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Escrito deste paciente para a participação neste estudo

_____ Data ____/____/____

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE B - FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Protocolo para primeira consulta e avaliação sistêmica

REGISTRO (RGHSP): _____ Data do preenchimento: ____/____/____

NOME: _____

DATA NASCIMENTO: ____/____/____ SEXO: () 1– F () 2– M Fone: _____

COR: () 1– Branca; () 2– Parda; () 3– Negra; () 4– Amarela

ENDEREÇO: _____

Início do acompanhamento: ____/____/____ ANO DIAGNÓSTICO: _____

INÍCIO DO FENÔMENO DE RAYNAUD: ____ (mês) ____ (ano)

INÍCIO DO PRIMEIRO SINTOMA EXCLUINDO-SE O FRY: ____ (mês) ____ (ano)

SINTOMAS INICIAIS: () 1– Fen. Raynaud; () 2– Pele; () 3– Articular; () 4 – Visceral;

PREENCHE CRITÉRIOS DO ACR: () SIM () NÃO

() Esclerodermia proximal

() Esclerodactilia

() Úlceras/microcicatrices/perda de substância de polpas digitais

() Fibrose intersticial bibasal

FORMA CLÍNICA: () 1– Difusa () 2– Limitada () 3– Sine Scleroderma
() 4– Overlap _____ () 5 – ES DE INICIO RECENTE

MEDICAÇÕES e DOSE: _____

Nifedipina: _____ mg/dia Anlodipino: _____ mg/dia Diltiazem: _____ mg/dia

Losartana: _____ mg/dia Captopril: _____ mg/dia Sildenafil: _____ mg/dia

Bosentana : _____ mg/dia AAS : _____ mg/dia Pentoxifilina: _____ mg/dia

Sistemas:

PELE

1. Calcinose: () Sim () Não

2. Mãos: () 1- Normal; () 2- Fase edematosa; () 3- Fase indurativa; () 4- Fase atrófica

3. Escore cutâneo total (Rodnan modificado): _____

DIREITO

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

DEDOS

MÃOS

ANTEBRAÇOS

BRAÇOS

FACE

TÓRAX

ABDOMEN

COXAS

PERNAS

DORSO PÉS

ESQUERDO

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

0 1 2 3

II - VASCULAR

4. Fenômeno de Raynaud () 1- Objetivo () 2- Subjetivo () Não
 5. Microcicatriz de polpas digitais () Sim () Não
 6. Ulcerações digitais ou de superfícies extensoras () Sim () Não
 7. Necrose ou amputação de extremidades () Sim () Não
 8. Telangiectasias () Sim () Não

III - MUSCULOESQUELÉTICO

9. Artrite/Sinovite () Sim () Não
 10. Contraturas em flexão (incluindo mãos em garra) () Sim () Não
 11. Crepitação Tendínea () Sim () Não
 12. Fraqueza muscular () Sim () Não
 13. Atrofia () Sim () Não

IV – ACOMETIMENTO VISCERAL**TRATO GASTROINTESTINAL**

14. EED ou Esofagograma Data: _____ () 1- NI; () 2 – Retardo Esvaziamento; ()
 Outros _____
 15. Manometria Data: _____ Resultado: _____
 16. Outros: _____

CARDIO-PULMONAR

17. PFP Data: _____ Resultado: _____ CVF: _____ l _____ % DL co _____
 18. TCAR TÓRAX Data: _____ () 1- NI; () 2- Bronquiectasias tração; () 3 -Vidro fosco;
 () 4 –Faveolamento () 5- _____
 19. ECOCARDIOGRAMA: Data: _____ () 1- Normal; () 2 – Derrame Pericárdico;
 () 3-Hipertrofia Câmaras: _____; () 4- Distúrbio Valvular: _____;
 5- Função diastólica: _____; 6- FE: _____
 PSAP: () _____ mmHg () – Não avaliada

RENAL

20. Crise Renal: () Sim () Não Diálise: () 1- Não; () 2- Temporária; () 3- Permanente

V- ANTECEDENTES PESSOAIS

25. Tabagismo () Sim () Não () 3- Ex-tabagista _____ anos/maço
 26. Diabetes () Sim () Não
 27. Neoplasia () Sim () Não Qual _____

VI - EXAMES LABORATORIAIS

- VHS: _____ PCR: _____ CK: _____ Cr: _____ C3: _____ C4: _____
 FAN: () Positivo; () Negativo Título _____ Padrão: _____
 Anti-centrômero: () Positivo; () Negativo () Não realizado
 Anti-Scl 70: () Positivo; () Negativo () Não realizado
 Marcar se positivo: anti PM-Scl () ; aRo () ; aLa () ; aSm () ; aRNP () ; aJo-1 ()

9. ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UFMS
Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANTICORPO ANTI-COLÁGENO TIPO V EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA: CORRELAÇÃO COM OUTROS AUTOANTICORPOS ESPECÍFICOS, COM OS CRITÉRIOS DE GRAVIDADE E DE ATIVIDADE DA DOENÇA

Pesquisador: ALEX MAGNO COELHO HORIMOTO
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Versão: 2
CAAE: 01921012.4.0000.0021

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 26357
Data da Relatoria: 31/05/2012

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma patologia do tecido conjuntivo de caráter auto-imune, extremamente heterogênea na sua apresentação clínica, com acometimento de vários sistemas e segue um curso variável e imprevisível (1). Sua etiologia permanece desconhecida, sendo sugerida uma causa multifatorial, possivelmente desencadeada por fatores ambientais em um indivíduo geneticamente predisposto (2). O componente genético das doenças autoimunes é revelado pelo risco aumentado do desenvolvimento de uma doença autoimune observado em gêmeos e irmãos do indivíduo afetado (3,4). A ES não é primariamente uma desordem genética, mas geralmente considera-se que a patologia realmente tenha um componente genético através de um relato de gêmeos homozigóticos que tinham concordância para a doença (5). Em 1953 Rees e Bennett descreveram esclerodermia localizada em pai e filha, seguindo-se várias publicações de esclerodermia familiar em diferentes populações e relações intrafamiliares (5,6). Além disso, têm sido relatadas associações entre HLA e a ES (5,7). Uma história familiar positiva representa o maior fator de risco já identificado para o desenvolvimento da ES (8). No entanto, a grande diminuição na taxa de concordância das doenças autoimunes entre irmãos quando comparada àquela entre gêmeos monozigóticos, suporta a presença de múltiplos genes contribuindo para a predisposição genética, incluindo a ES (9). Contrariamente, Maddison et al encontraram a prevalência de anticorpos antinucleares (ANA) em 27% dos parentes dos pacientes com ES, mas também em 24% dos cônjuges dos pacientes (10). A pesquisa de ANA em pacientes com ES, seus parentes e cônjuges, foi repetida por outros autores, sugerindo que ambos os fatores, genético e ambiental, influenciam a autoimunidade na ES (7,8). O desenvolvimento de esclerodermia ou condições semelhantes à esclerodermia (escleroderma-like) em associação com vários agentes tóxicos incluindo sílica, silicone, cloreto de vinil, solventes industriais e óleo de couza, corrobora a possibilidade de fatores ambientais como causa da patologia (7,11). Aparentemente, o desenvolvimento de uma doença autoimune é altamente dependente de um antecedente genético favorável e permissivo, mas outros fatores desencadeantes tais como vírus, bactérias e substâncias químicas levam a uma alteração na auto-reatividade e perda da tolerância imunológica (12). As infecções virais são as principais candidatas a fatores ambientais na promoção de doenças autoimunes, devido a sua capacidade de desencadear uma vigorosa ativação imune e induzir doenças autoimunes em modelos animais (13). Maul et al clonaram e seqüenciaram o principal epítipo do antígeno marcador de esclerose sistêmica difusa (topoisomerase 1) e encontraram na proteína uma seqüência de aminoácidos que é similar a proteína retroviral p30gag, sugerindo que um agente retroviral poderia estar envolvido na patogênese da ES (14). Outro trabalho interessante, que sugere a forte ligação entre infecção e autoimunidade, demonstrou que a infecção experimental por Mycoplasma induziu uma resposta semelhante à esclerodermia em camundongos, com formação de autoanticorpo anticentrômero e o tratamento dos camundongos com antibióticos preveniu o desenvolvimento de autoanticorpos (15). A marca registrada da ES consiste na tríade de envolvimento vascular, autoimunidade e fibrose tecidual, levando a acometimento cutâneo além de diversos órgãos internos como pulmão, coração, trato gastrointestinal entre outros (16). A etiopatogenia

da ES pode ser iniciada na vasculatura, com evidências sugerindo que algumas alterações morfológicas e desregulação do controle do tônus vascular podem estar aparentes antes do desenvolvimento da doença e são as manifestações clínicas mais precoces da doença (17,18). Os eventos patológicos subseqüentes na ES podem incluir comunicação prejudicada entre células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos; ativação de linfócitos; produção de autoanticorpos.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Avaliar a presença do anticorpo anti-colágeno tipo V em pacientes portadores de Esclerose Sistêmica (ES) e correlacionar sua positividade com a de outros autoanticorpos, bem como com índices de atividade e gravidade da doença.

Objetivo Primário:

Avaliar a presença do anticorpo anti-colágeno tipo V em pacientes portadores de Esclerose Sistêmica (ES) e correlacionar sua positividade com a de outros autoanticorpos, bem como com índices de atividade e gravidade da doença.

Objetivo Secundário:

- avaliar as características sócio-demográficas dos pacientes com ES na Região Centro-Oeste;
- conhecer o perfil de anticorpos no soro de pacientes com diagnóstico de ES;
- caracterizar as manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com ES;
- contribuir na investigação da importância do anti-colágeno tipo V em pacientes com ES e seu possível papel prognóstico;
- realizar um trabalho interdisciplinar, integrando alunos de Graduação do Curso de Medicina e médicos residentes das áreas de Reumatologia e Clínica Médica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS);

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Todos os materiais e técnicas utilizados para a coleta de exames são seguros e esterilizados, não representando risco à sua saúde. Os riscos e desconfortos se relacionam com a coleta de sangue, sendo que poderá ocorrer ou não dor durante a coleta e formação de hematoma no local da punção. Não são esperados outros riscos com a participação dos pacientes.

Benefícios:

As questões abordadas neste trabalho são de interesse para inúmeras áreas relacionadas à saúde: Medicina, Saúde Coletiva, Enfermagem, Assistência Social e outras. O conhecimento dos resultados traria um aprimoramento para todos os profissionais e estudantes destas áreas. Permitiria uma maior compreensão das manifestações clínicas da patologia, o que conseqüentemente geraria uma melhor qualidade de atendimento a esta população, que é negligenciada em todos os centros de atendimento médico do país, muitas vezes devido falhas no diagnóstico precoce e protocolos de avaliação e tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

3.1- Descrição do Estudo

Trata-se de um estudo observacional, de corte transversal e do tipo retrospectivo, fundamentado nos referenciais teóricos da Imunologia da Esclerose Sistêmica.

3.2- Seleção dos Pacientes

- a- Serão selecionados 40 pacientes com diagnóstico de Esclerose Sistêmica, segundo critérios expostos abaixo. O número da amostra foi determinado de acordo com o trabalho existente na literatura sobre anticorpos anti-colágeno (Riente et al, 1995 (47)), uma vez que se trata de patologia rara e não existem dados sobre incidência e prevalência da mesma na população brasileira.
- b- A seleção prévia dos pacientes, será feita a partir do levantamento dos Prontuários Médicos, do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FMUFMS).
- c- Os pacientes serão selecionados aleatoriamente no ambulatório de Outras Doenças do Colágeno do Serviço de Reumatologia da FMUFMS, e não será levado em consideração nenhum fator clínico ou laboratorial específico para a inclusão dos mesmos, tendo em vista maior reprodutibilidade na população geral.
- d- Os pacientes para serem selecionados, deverão obedecer os seguintes critérios:

Critérios de Inclusão:

- Sexo: qualquer;
- Faixa etária: qualquer;
- Preencher os Critérios diagnósticos para ES do ACR de 1980 (50) ou de ES precoce LeRoy e Medsger de 2001 (51);
- Ter assinado o Termo de Consentimento previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (Anexo 1).

Critérios de exclusão:

- Pacientes analfabetos ou com dificuldade intensa em compreender os questionários
- Pacientes que apresentam outras doenças infecciosas associadas ou neoplasias malignas.

e- As informações necessárias para a caracterização sócio-demográfica e clínica da doença, serão obtidas a partir dos registros médicos contidos nos Prontuários de cada paciente e complementadas com entrevista do paciente.

f- Será solicitada a autorização do Comitê de Ética do Hospital Universitário da UFMS, para utilização das informações dos Prontuários e coleta de soro dos pacientes.

g- Durante a entrevista com o paciente, será solicitada a concordância do paciente em participar da pesquisa após explanação e entendimento da mesma e assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diligências atendidas.

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Situação do Parecer:

Aprovado

CAMPO GRANDE, 24 de Maio de 2012

Assinado por:

Ernesto Antonio Figueiró Filho

ANEXO B - Trabalhos aprovados na Revista Brasileira de Reumatologia



CLÍNICA ACTIVITÉ <clinicaactivite@gmail.com>

Your Submission

1 mensagem

Brazilian Journal of Rheumatology <rheumatol@terra.com.br>
 Para: clinicaactivite@gmail.com, amchor@ibest.com.br

21 de setembro de 2014 17:40

Ms. Ref. No.: BJR-D-14-00080R3

Title: AUTOANTICORPOS EM ESCLEROSE SISTÊMICA E SUA CORRELAÇÃO COM AS
 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA EM PACIENTES DO CENTRO OESTE DO BRASIL.
 Brazilian Journal of Rheumatology

Dear ALEX MAGNO,

I am pleased to inform you that your paper "AUTOANTICORPOS EM ESCLEROSE SISTÊMICA E
 SUA CORRELAÇÃO COM AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA EM PACIENTES DO
 CENTRO OESTE DO BRASIL." has been accepted for publication in Brazilian Journal of
 Rheumatology.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to Brazilian Journal of Rheumatology.

Yours sincerely,

Roberto Ezequiel Heymann, MD, PhD
 Editor-in-Chief
 Brazilian Journal of Rheumatology

Comments from the editors and reviewers:

Reviewer #1: Revisão satisfatória.

For further assistance, please visit our customer support site at
<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of
 topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials.
 You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of
 our customer support representatives.



CLÍNICA ACTIVITÉ <clinicaactivite@gmail.com>

Your Submission

1 mensagem

Brazilian Journal of Rheumatology <rbrumatol@terra.com.br>

22 de dezembro de 2014 22:47

Para: clinicaactivite@gmail.com, amchor@ibest.com.br

Ms. Ref. No.: BJR-D-14-00120R2

Title: SOBREPOSIÇÃO ENTRE ESCLEROSE SISTÊMICA E ARTRITE REUMATÓIDE EM PACIENTES DO CENTRO OESTE DO BRASIL.

Brazilian Journal of Rheumatology

Dear ALEX MAGNO,

I am pleased to inform you that your paper "SOBREPOSIÇÃO ENTRE ESCLEROSE SISTÊMICA E ARTRITE REUMATÓIDE EM PACIENTES DO CENTRO OESTE DO BRASIL." has been accepted for publication in Brazilian Journal of Rheumatology.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to Brazilian Journal of Rheumatology.

Yours sincerely,

Roberto Ezequiel Heymann, MD, PhD
Editor-in-Chief
Brazilian Journal of Rheumatology

Comments from the editors and reviewers:

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO C - Classificação Qualis da Revista Brasileira de Reumatologia

ISSN	TÍTULO	ESTRATO	ÁREA DE AVALIAÇÃO	STATUS
1809-239X	Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
0100-7203	Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Impresso)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1516-8484	Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
2175-3423	Revista Brasileira de História & Ciências Sociais	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1983-4713	Revista Brasileira de História da Ciência	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
2176-3275	Revista Brasileira de História da Ciência	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1519-5902	Revista Brasileira de História da Educação	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1519-955X	Revista Brasileira de História da Matemática	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1983-2850	Revista Brasileira de História das Religiões	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1414-5685	Revista Brasileira de Informática na Educação	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1677-2504	Revista Brasileira de Inovação	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
2178-2822	Revista Brasileira de Inovação	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1517-8692	Revista Brasileira de Medicina do Esporte (Impresso)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
0100-2430	Revista Brasileira de Medicina Veterinária	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1679-3390	Revista Brasileira de Orientação Profissional	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
0032-7299	Revista Brasileira de Otorrinolaringologia (Impresso)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1519-7530	Revista Brasileira de Paleontologia	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
0103-846X	Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1984-2961	Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1982-6125	Revista Brasileira de Pesquisa em Turismo	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1516-0572	Revista Brasileira de Plantas Medicais (Impresso)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
1678-166X	Revista Brasileira de Política e Administração da Educação	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
0486-641X	Revista Brasileira de Psicanálise (Impresso)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
0482-5004	Revista Brasileira de Reumatologia (Impresso)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado