

ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN ^{n/23}

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA PELE NA ESCLEROSE SISTÊMICA
ESTUDO QUANTITATIVO E QUALITATIVO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Doutor em medicina.

Area de concentração: Anatomia Patológica

Orientador: Prof. Dr. Athanase Billis[†].

Campinas-SP

1992

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	de
Nº CHAMADA	
V.	Am-87a
TEMPO	16.47
PROC.	218/92
C. D.	
PREÇO	CR\$ 20.000,00
DATA	10/06/92
S. C. P.	

CM-00027602-0

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTAL - UNICAMP

I	-----	I
I		I
I	Amstalden, Eliane Maria Ingrid	I
I	Am87a Alterações histopatológicas da pele na	I
I	esclerose sistêmica : estudo quantitativo e	I
I	qualitativo / Eliane Maria Ingrid Amstalden	I
I	Campinas, SP [s.n.], 1992.	I
I		I
I	Orientador : Athanase Billis.	I
I	Tese (doutorado) - Universidade Estadual	I
I	de Campinas, Faculdade de Ciências	I
I	Médicas.	I
I		I
I	1. Escleroderma sistêmico. 2. Pele.	I
I	3. Histologia. I. Billis, Athanase. II.	I
I	Universidade Estadual de Campinas, Facul-	I
I	dade de Ciências Médicas. III. Título.	I
I	20. CDD- 616.77	I
I	- 611.018 977	I
I	- 611.018	I
I	-----	I

Indices para catálogo sistemático :

1. Escleroderma sistêmico 616.77
2. Pele 611.018 977
3. Histologia 611.018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Arnaldo e Helena,
pelo exemplo de vida, dedicação, bondade e trabalho.

Aos meus irmãos,
pela grandiosa contribuição na minha formação pessoal,
pelo carinho e incentivo incessantes.

A D. Carmen e Sr. Apolinar,
pelo afeto e ajuda em todas as horas.

Aos meus filhos Beatriz e Marcos,
motivação de vida e alegrias constantes.

Ao Manoel,
companheiro maravilhoso, com todo meu amor.

Aos doentes,
para quem espero estar contribuindo com
um pouco do que aprendi.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Athanase Billis, pelo incentivo, otimismo e confiança depositados. Pela orientação segura e atenção com que sempre me ouviu e as valiosas sugestões em momentos decisivos deste trabalho, agradeço profundamente.

Ao Prof. Dr. João Francisco Marques Neto, pela sólida experiência e conhecimento ímpar nesta moléstia, pela avaliação clínica de todos os doentes desta casuística, pelas críticas construtivas e credibilidade na realização deste trabalho, quero externar o meu grande reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Magna, pela competência e dedicação, não medindo esforços, em dispor parte do seu tempo tão precioso, na execução da análise estatística deste estudo, muito obrigada.

Aos meus mestres Prof. Dr. José Lopes de Faria e Prof. Dr. Sílvio dos Santos Carvalhal, alicerces no aprendizado de anatomia patológica, exemplo científico que me estimularam a pesquisa e docência, sou eternamente credora.

A todos os docentes do Departamento de Anatomia Patológica FCM - UNICAMP, grandes responsáveis pela minha formação profissional, pelos constantes ensinamentos, pelas oportunidades concedidas, pelo ambiente próspero de trabalho, pela confiança e amizade, agradeço imensamente.

A Profa. Dra. Maria Leticia Cintra, exemplo de sabedoria e humildade, influência marcante na minha vida profissional e na escolha da Anatomia Patológica como especialização. Por sua amizade sincera, disponibilidade e axílios constantes, sou eternamente grata.

A Profa. Dra. Patrícia Sabino de Matos, pelas facilidades concedidas na aquisição dos blocos em parafina dos fragmentos de biópsias e prontuários de cinco doentes acompanhados no hospital da FM-PUCCAMP. Pela amizade e consideração, durante todos esses anos de convivência, os meus afetuosos agradecimentos.

Aos médicos residentes, quero agradecer a realização de biópsias e a convocação para estudos complementares de doentes e doadores.

A Sra. Sílvia Helena Rocha e Silva, pelo primoroso trabalho técnico no preparo das lâminas para análise histológica em colorações especiais e de rotina, o meu grande reconhecimento.

Ao Sr. Marco Antônio Gongora, pela revelação e execução cuidadosas de todas as cópias fotográficas das ilustrações deste exemplar, muito obrigada.

A família Imanishi, pela orientação operacional do computador, em diversas etapas da realização deste trabalho, serei sempre grata.

E a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta obra, o meu muito obrigado.

ÍNDICE

Página

RESUMO E PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSOES	1x
SUMMARY AND MAIN RESULTS AND CONCLUSIONS.	xv
1 INTRODUÇÃO.	01
1.1 Conceito,histórico e epidemiologia	01
1.2 Etiopatogenia.	04
1.3 Formas clínicas e diagnóstico.	13
1.4 Classificação geral da esclerodermia	15
1.5 Diagnóstico clínico.	16
1.6 Histopatologia	18
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.	22
3.1 Casuística	22
3.2 Avaliação clínica.	24
3.2.1 Forma clínica da ES	24
3.2.2 Estadiamento clínico.	25
3.3 Avaliação histopatológica.	26
3.3.1 Epiderme.	27
3.3.1.1 Atrofia.	27
3.3.1.2 Retificação.	27
3.3.1.3 Distúrbio de pigmentação melânica.	29
3.3.2 Derme e hipoderme	32
3.3.2.1 Proliferação de fibras colágenas	32
3.3.2.1.1 Método quantitativo	32
3.3.2.1.2 Método qualitativo.	34

3.3.2.2	Atrofia de anexos.	37
3.3.2.3	Alteração de vasos	39
3.3.2.4	Infiltrado inflamatório.	39
3.3.3	Metodologia estatística	40
4	RESULTADOS E TABELAS.	41
4.1	Avaliação clínica.	41
4.2	Avaliação histopatológica.	44
4.2.1	Atrofia da epiderme	49
4.2.2	Extensão da retificação da epiderme	50
4.2.3	Distúrbio de pigmentação melânica	50
4.2.4	Proliferação de fibras colágenas.	51
4.2.4.1	Método quantitativo.	53
4.2.4.2	Método qualitativo	54
4.2.5	Atrofia de anexos	57
4.2.6	Alteração de vasos.	58
4.2.7	Infiltrado inflamatório	64
4.3	Correlação entre os principais achados histopatoló- gicos entre si e em relação a parâmetros clínicos .	65
4.3.1	Espessura da epiderme e :	
4.3.1.1	Proliferação de fibras colágenas	65
4.3.1.2	Idade.	65
4.3.1.3	Peso	66
4.3.1.4	Tempo de doença.	66
4.3.2.	Distúrbio de pigmentação melânica e :	
4.3.2.1	Proliferação de fibras colágenas	67
4.3.2.2	Forma clínica.	68
4.3.2.3	Estadiamento clínico	69

4.3.3	Proliferação de fibras colágenas e :	
4.3.3.1	Método quantitativo e qualitativo.	70
4.3.3.2	Atrofia de anexos.	72
4.3.3.3	Alteração de vasos	75
4.3.3.4	Idade.	76
4.3.3.5	Peso	76
4.3.3.6	Tempo de doença.	76
4.3.3.7	Forma clínica.	77
4.3.3.8	Estadiamento clínico	78
4.3.4	Alteração de vasos e :	
4.3.4.1	Idade	79
4.3.4.2	Tempo de doença	80
4.3.4.3	Forma clínica	81
4.3.4.4	Estadiamento clínico.	81
5	DISCUSSÃO	82
5.1	Atrofia e retificação da epiderme.	82
5.2	Distúrbio de pigmentação melânica.	84
5.3	Proliferação de fibras colágenas	87
5.4	Atrofia de anexos.	93
5.5	Alteração de vasos	94
5.6	Infiltrado inflamatório.	101
5.7	Correlação entre os principais achados histopatoló- gicos entre si e em relação a parâmetros clínicos. .	102
6	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	106
7	REFERÊNCIAS	108

RESUMO E PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES

A avaliação das alterações cutâneas na Esclerose Sistêmica (ES) é de fundamental importância, uma vez que a pele é considerada o grande elemento diagnóstico e o órgão mais freqüentemente envolvido nesta moléstia. Existem divergências em relação aos achados histopatológicos nos vários níveis da pele, bem como são raros os estudos quantitativos na abordagem e avaliação dessas alterações.

Este estudo se baseou na avaliação comparativa da pele de doentes com ES e controles, no que se refere aos seguintes aspectos histopatológicos: a avaliação da epiderme quanto à atrofia, retificação e distúrbio de pigmentação melânica; a análise da derme e hipoderme quanto à proliferação de fibras colágenas; atrofia de anexos; alterações de vasos; e a presença de infiltrado inflamatório. Observou-se também a correlação dos principais achados histopatológicos entre si e em relação a parâmetros clínicos como a idade, o peso, tempo de doença, forma e estadiamento clínicos.

Foram avaliados 48 doentes e 16 controles. As amostras foram obtidas através de biópsia de pele da face dorsal da terceira falange proximal direita. Os cortes histológicos foram examinados através de métodos quantitativo e qualitativo e os resultados encontrados foram submetidos a estudo estatístico.

PRINCIPAIS RESULTADOS

1- A espessura da epiderme, dos doentes, na região supra-papilar não apresentou diferença, porém foi significativamente maior a nível do cone epitelial, comparativamente aos controles.

2- A epiderme não sofreu variações da sua espessura em função da intensidade de proliferação de fibras colágenas, da idade e do peso, nos doentes.

3- Observou-se redução da espessura dos cones epiteliais com o aumento do tempo de doença.

4- Não houve diferença significativa entre a extensão da retificação da epiderme entre doentes e controles.

5- Distúrbio de pigmentação melânica esteve presente em 54,16% das amostras de pele dos doentes, e em nenhum controle.

6- A ocorrência do distúrbio de pigmentação melânica mostrou-se independente de fatores tais como: a proliferação de fibras colágenas, forma clínica e estadiamento clínico.

7- O padrão morfológico e tintorial das fibras colágenas apresentou alterações que variaram desde fibras finas, coradas mais delicadamente pela H&E e com maior número de fibroblastos, a fibras mais eosinófilas, hialinizadas, densamente compactadas e com menor número de fibroblastos.

8- O derma papilar não exibiu alterações distintas nas amostras de pele dos doentes em relação aos controles.

9- O nível da proliferação colágena ocorreu na interface dermo-hipodérmica, com extensão ao subcutâneo e substituição variável do tecido adiposo.

10- A análise da proliferação de fibras colágenas, pelo método quantitativo, mostrou diferença significativa para mais nos terços médio e inferior dos fragmentos de pele entre doentes e controles, sendo ainda maior a nível do terço inferior.

11- O estudo da proliferação de fibras colágenas, pelo o método qualitativo, demonstrou não haver diferença entre as duas leituras, sendo que a diferença máxima entre os valores atribuídos, em observações pareadas, nunca foi maior do que um grau, e com índice de reprodutibilidade intra-observador de 82,9%.

12- A análise estatística demonstrou equivalência entre os métodos quantitativo e qualitativo na avaliação de proliferação de fibras colágenas.

13- A proliferação de fibras colágenas não demonstrou variações em função da idade, peso, tempo de doença, forma clínica e estadiamento clínico nos doentes com ES.

14- Não se observou atrofia das glândulas sudoríparas, comparativamente aos controles, bem como em relação à intensidade da proliferação de fibras colágenas.

15- Alteração vascular foi o segundo achado histopatológico mais freqüente, presente em 67% da pele dos doentes.

16- O tipo de lesão mais notável e consistente nos vasos comprometidos foi o espessamento da íntima de arteríolas e pequenas e médias artérias dermo-hipodérmicas.

17- A intensidade das lesões vasculares não se mostrou proporcional ao grau de proliferação colágena.

18- Observou-se uma tendência a maior presença de lesão vascular na forma clínica inflamatória.

19- Não se detectou correspondência entre a presença de lesão vascular em função da idade, tempo de doença e estadiamento clínico.

20- O infiltrado inflamatório foi o achado histopatológico menos freqüente e mais discreto nos fragmentos de pele dos doentes e ausente nos controles.

PRINCIPAIS CONCLUSÕES

1- A epiderme não é atrófica nem retificada na ES e os cones epiteliais são proeminentes comparativamente aos controles, podendo sofrer redução na sua espessura em função do tempo de doença.

2- O distúrbio de pigmentação melânica, presente em 54,16% dos doentes e em nenhum dos controles, sugere que, mesmo sendo um achado histopatológico inespecífico, deve ser valorizado quando presente, podendo contribuir para o diagnóstico da ES, especialmente, quando os demais achados histopatológicos são discretos.

3- A proliferação de fibras colágenas é o achado histopatológico mais notável e consistente nas amostras de pele dos doentes com ES, comparativamente aos controles.

4- Tanto o método quantitativo como o qualitativo podem ser utilizados na avaliação da fibrose.

5- A maior diferença observada no terço inferior, quanto à proliferação de fibras colágenas entre doentes e controles, mostra a importância da biópsia incluir o hipoderma para a correta avaliação da fibrose.

6- Considerando-se que o método quantitativo, proposto na avaliação da proliferação de fibras colágenas, mostrou ser de fácil utilização e sensível, para se medir a intensidade do envolvimento cutâneo na ES, parece-nos que este método poderá ser de grande valia na avaliação de respostas terapêuticas, bem como parâmetro da evolução natural desta doença.

7- A proliferação de fibras colágenas e a lesão vascular (caracterizada basicamente pelo espessamento da íntima) apresentam graus variados de intensidade, não proporcionais entre si e independentes do tempo de doença e da extensão do comprometimento cutâneo e visceral, bem como não contribuem na identificação das formas clínicas da ES.

8- A proliferação de fibras colágenas e a alta freqüência de lesões vasculares, nos achados histopatológicos, comprovam ser as alterações fundamentais ou marcas da ES, consolidando a própria definição desta doença.

SUMMARY AND MAIN RESULTS AND CONCLUSIONS

The evaluation of cutaneous changes in Systemic Sclerosis (SSc) is very important, because the skin is considered fundamental for the diagnosis and it is the organ more frequently involved in this disease. There are many disagreements about the histopathologic features in the various levels of the skin, and there are scarce quantitative studies evaluating these alterations.

This study based on the comparative evaluation of the skin of patients with SSc and controls, considers the following histopathologic features: the appraisal of the epidermis concerning the atrophy, retification and melanin pigmentary disturbance; the analysis of the dermis and subcutaneous concerning the fibers and atrophy of the cutaneous appendages; vascular abnormalities and the presence of inflammatory infiltrates. The relationship between the main histopathologic features themselves and in relation to the clinical parameters like age, weight, duration of the disease, clinical form classification and clinical stage, were studied.

Forty eight patients with SSc and sixteen controls were analysed. The skin samples were obtained by biopsies of the dorsal face of the right third proximal phalange. The microscopic study was done by quantitative and qualitative methods and the results were submitted to statistic study.

MAIN RESULTS

1- The epidermis of SSc patients had no difference of its thickness on the suprapapillary level, but was significantly higher on the rete ridges, compared to controls.

2- The thickness of the epidermis does not suffer variations in function of the intensity of proliferation of collagen fibers, age and weight of SSc patients.

3- There was reduction in the thickness of the epidermal rete ridges that was proportional to the duration of the disease.

4- There was no difference of the extension of epidermal retification between patients and controls.

5- Melanin pigmentary disturbance was present in 54,16% of the patients' skin samples and in no controls.

6- The occurrence of melanin pigmentary disturbance showed no correlation with these factors: proliferation of collagen fibers, clinical form and clinical stage.

7- The morphological and tintorial pattern of the collagen fibers showed variable alterations, ranging from thin fibers faintly stained by H&E and with higher number of fibroblasts to collagen fibers more deeply stained with eosin, hialinized, closely packed and with few fibroblastos.

8- The papillary dermis showed no distinct alterations in relation to controls.

9- The level of proliferation of collagen fibers occurred on dermohypodermal junction, with extension to subcutaneous tissue with variable replacement of the subcutaneous fat.

10- The analysis of proliferation of collagen fibers, through the quantitative method, showed significant difference in the middle and lower third of the skin samples, between patients and controls, and was higher in the lower third.

11- The study of proliferation of collagen fibers, through the qualitative method, showed no difference between the two examinations. The highest difference between the attributed values in matched observations, never was higher than one histological degree and with an intraobserver index of reproducibility of 82,9%.

12- The statistic analysis revealed correspondence between the quantitative and qualitative methods regarding the evolution of proliferation of collagen fibers.

13- The proliferation of collagen fibers displayed no variations in function to age, weight, duration of the disease, clinical form and clinical stage in SSc patients.

14- It was not observed atrophy of eccrine sweat glands, comparatively to controls as well as in relation to the intensity of proliferation of the collagen fibers.

15- Vascular lesions was the second more frequent histopathologic finding and it was present in 67% of the patients' skin samples.

16- The most striking and consistent finding in the vessels was the intimal thickness of arterioles and small and medium size arteries of the dermis and hypodermis.

17- The intensity of vascular lesions was not proportional to the degree of proliferation of collagen fibers.

18- It was observed a tendency to higher vascular lesions in the inflammatory clinical form (dSSc).

19- It was not detected correspondance between the presence of vascular lesions in function of age, duration of the disease and clinical stage.

20- The inflammatory infiltrate was the less frequent and more discret histopathologic finding present in patients' skin samples and it was absent in controls.

MAIN CONCLUSIONS

1- The epidermis of SSc patients neither is atrophic nor retified and the rete ridges are more prominent than in controls, and can suffer reduction of its thickness in function to duration of the disease.

2- The melanin pigmentary disturbance, present in 54,16% of the patients and in no controls, suggests that, despite the fact that it is an inespecific histopathologic finding, should be considered when present and could contribute to the diagnosis of the SSc, specially when the other histopathologic features are discrete.

3- The proliferation of the collagen fibers is the most striking and consistent microscopic finding in SSc patients' skin samples, compared to controls.

4- The qualitative method as well as the quantitative method can be used for the evaluation of the fibrosis.

5- The higher diference observed in the lower third of the skin as regarding the proliferation of collagen fibers, shows the importance of the biopsy to include the subcutaneous tissue for the right evaluation of the degree of fibrosis.

6- Considering that the quantitative method, proposed in the evaluation of proliferation of collagen fibers, showed to be a method of easy utilization and sensible to measure the intensity of cutaneous involvement in SSc, and seems to be a method of great value in the evaluation of therapeutic response as well as a parameter of the natural evolution of the disease.

7- The proliferation of collagen fibers and the vascular lesions (fundamentally characterized by intimal thickness) have variable degrees of intensity, not proportional among themselves and independent of the disease duration and the extension of cutaneous and visceral involvement, as well as they don't contribute for the identification of the clinical forms of the SSc.

8- The proliferation of collagen fibers and the high frequency of vascular lesions on histopathologic findings, proved be the fundamental alterations or the label of SSc, consolidating the proper definition of this disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONCRITO, HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença crônica do tecido conjuntivo caracterizada por fibrose e alterações vasculares que acometem indistintamente a pele e órgãos internos, com intensidade e curso evolutivo variáveis (MEDSGER, 1989).

O termo esclerose tem origem nas palavras gregas: "sklêrós" que significa duro e "ôsis", sufixo que indica condição, processo, estado mórbido e até mesmo aumento anormal.

É conhecida desde a antigüidade através de relatos de pacientes que "mumificavam em vida", deixados por HIPOCRATES (460-370 A.C.) e GALENO (131-201 A.D.) apud RODNAN & BENEDEK (1962).

Para WORLTERS (1892) apud RODNAN & BENEDEK (1962), muitos manuscritos foram encontrados, os quais datam desde centenas de anos antes de Cristo até o final do século passado, porém, pela avaliação deste autor há ressalvas devido à dificuldade ou mesmo à impossibilidade de aceitar como verdadeiros exemplos de ES, em vista das descrições vagas e inexatas.

Segundo revisão de RODNAN & BENEDEK (1962), o primeiro relatório convincente da doença foi encontrado em monografia escrita por CARLO CURZIO em 1753, sob a denominação de "Ichthyosis córnea", atribuindo-se a designação de Esclerodermia a GINTRAC em 1847 e foi a partir dos trabalhos de OSLER (1892), MATSUI (1924) e MASUGI & YA-SHU (1938), que se reconheceu a natureza sistêmica desta doença, pela demonstração do

envolvimento de órgãos internos.

A partir do conceito unitário das doenças difusas do tecido conjuntivo, proposta por KLEMPERER et alii (1942), essa doença passou a ser estudada paralelamente ao Lúpus Eritematoso, Dermatopolimiosite e Artrite Reumatóide, sendo que foi designada como Esclerose Sistêmica Progressiva em 1945 por GOETZ, no sentido de cristalizar o caráter difuso e exprimir o seu curso evolutivo.

A ausência de progressão da doença em muitos pacientes levou vários observadores (TUFFANELLI & WINKELMANN, 1961; D'ANGELO et alii, 1969; MEDSGER & MASI, 1971) a adotarem o termo Esclerose Sistêmica ou o seu sinônimo Esclerodermia Sistêmica, que são utilizados até os dias de hoje, dando-se preferência para o primeiro, rejeitando-se o termo esclerodermia isolado, por significar meramente "pele dura".

Do ponto de vista epidemiológico, a ES é uma doença relativamente pouco comum e sua freqüência está relacionada ao melhor reconhecimento dos aspectos clínicos, principalmente das formas onde o envolvimento visceral precede o cutâneo, ou ainda em uma interpretação mais definida do fenômeno de Raynaud, sinal precoce que pode preceder de muito o aparecimento das primeiras manifestações desta doença (RODNAN, 1963).

A freqüência desta doença entre as collagenoses é menor que a Artrite Reumatóide e o Lúpus Eritematoso, entretanto é maior que a Dermatopolimiosite e Angiites Necrosantes Primárias (MARQUES NETO & SAMARA, 1985).

Segundo STEEN & MEDSGER (1990) a incidência da ES pode

variar consideravelmente. Estudos de revisão desses autores demonstram incidência anual de 0,6 a 18,7 casos novos por milhão de habitantes, com acometimento mais freqüente do sexo feminino em proporções que variam com as diferentes casuísticas entre 2:1 a 6:1. MEDSGER & MASI (1971) encontraram proporção de 15 mulheres para um homem, entre 20 e 44 anos de idade, e de 1,8 mulheres para um homem acima dos 45 anos.

Não existe diferença significativa quanto à raça, entretanto, em negros o diagnóstico é mais tardio e o prognóstico parece ser pior (MARQUES NETO & SAMARA, 1985).

A incidência aumenta com a idade, é maior entre os 45 e 64 anos, sendo rara na infância e em homens abaixo dos 30 anos. A mortalidade é crescente com a idade e em mulheres negras, numa proporção de duas a três vezes maior, comparativamente com mulheres brancas (STEEN & MEDSGER, 1990).

1.2 ETIOPATOGENIA

É doença de etiopatogenia ainda pouco esclarecida. Apresenta lesão tecidual relacionada a distúrbios na regulação da função fibroblástica, associada a alterações dos sistemas vascular e imune.

A ausência de um modelo "in vivo" dificulta sobremaneira a interpretação dos achados anatômicos e a proposição de seus mecanismos etiopatogenéticos.

Teorias associadas a distúrbio de origem endócrina têm sido aventadas. O trabalho de BRADY (1975) comprova decréscimo da atividade enzimática da collagenase nas áreas envolvidas pela doença. Os estudos de KEISER et alii (1971) e HERRMANN et alii (1982) demonstram respectivamente aumento da atividade enzimática da hidroxilase prolina-protocolágena e β -N-acetil-glucosaminidase e β -galactosidase em pacientes com ES comparada com controles normais. Qualquer uma dessas alterações enzimáticas leva a um denominador comum que é o aumento da produção de colágeno.

Também tem sido aventada indução de natureza infecciosa: bacteriana (CANTWELL & KELSO, 1971), viral (FLEISCHMAJER, 1977; HAUSTEIN & ZIEGLER, 1985) e por espiroqueta (ABERER et alii, 1987). A indução de natureza medicamentosa (Bleomicina), tem sido proposta por FINCH et alii (1980).

Parece existir predisposição genética em razão de ter sido descrita distribuição familiar em alguns casos, bem como demonstração de anticorpos antinucleares positivos em 56% de familiares próximos assintomáticos (GREGER, 1975; JABLONSKA, 1975 apud FLEISCHMAJER, 1977).

Evidências de alterações imunopatogenéticas como os antígenos de histocompatibilidade de classe I, tipos: HLA-A9, HLA-B8 e HLA-B27 e de classe II, tipos: HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR5 e HLA-DRW3 têm sido demonstrado mais em pacientes esclerodérmicos do que na população geral (BIRNBAUM et alii, 1977; KRCILLA et alii, 1981 ; LYNCH et alii, 1982). Segundo GLADMAN et alii (1981) o HLA-DR5 estaria ligado a maior gravidade da doença e o HLA-DRW3 seria mais comum na forma CREST da ES (GERMAIN et alii, 1981).

LIVINGSTON et alii (1987) demonstraram aumento significativo de HLA-DRW52 em esclerodérmicos caucasóides e de HLA-DR6.1 em esclerodérmicos da raça negra.

Anormalidade do sistema imune humoral, como a presença de hipergamaglobulinemia e produção de auto-anticorpos têm sido demonstradas nestes doentes por vários autores, sendo os auto-anticorpos antinucleares (ANA) os mais freqüentes, em torno de 60 a 90% dos casos e o anti-centrômero (ACA) e anti-esclerodermia 70 (Scl-70) presentes em aproximadamente 20% dos esclerodérmicos (CATOGGIO et alii, 1983; BLACK et alii, 1984; LIVINGSTON et alii, 1987).

Segundo FRITZLER & KINSELLA (1980), o auto-anticorpo anti-centrômero (ACA) está freqüentemente relacionado com a forma CREST da doença.

Questiona-se a possibilidade desses anticorpos lesarem diretamente as células endoteliais através de um fator sérico citotóxico e, indiretamente através da indução de células linfóides T citotóxicas "Killer" (CD8) ou, através da

alteração do metabolismo dos fibroblastos.

Aumento de imunoglobulinas séricas do tipo IgG e/ou IgM, bem como frações do complemento (C3 e C4) tem sido demonstrado sob a forma de depósitos nas biópsias cutâneas, a nível da junção dermo-epidérmica, principalmente nas formas difusas (SHIBESHI et alii, 1989).

A imunidade celular na ES tem sido estudada exaustivamente, sendo fortemente sugerida pela presença de infiltrado, comumente encontrado nas fases iniciais da doença, constituído de linfócitos T (KONDO et alii, 1976).

Ocorre um decréscimo de linfócitos T circulantes com distribuição normal de linfócitos tipo B, sendo que a relação T "helper"/ T "supressor" (CD4/CD8) está aumentada, devido a um aumento de células T "helper" (CD4) e, em outros casos, por redução de células T "supressor" (CD8) (KHRESMANN et alii, 1982).

Segundo KRAKAUER et alii (1981), a função das células T "helper" está provavelmente aumentada, o que explicaria um excesso de produção de linfocinas que estimulariam a síntese de colágeno através dos fibroblastos (JOHNSON & ZIFF, 1976).

Alterações do sistema vascular capilar e arteriolar nos vários tecidos têm sido interpretado como o alvo da agressão inicial na patogenia da ES (NORTON & NARDO, 1970) e a indução deste processo ocorreria devido a um fator endógeno (imunológico) ou exógeno (tóxico), HAUSTEIN et alii (1986).

A consequência do dano à célula endotelial seria a liberação de enzimas lisossomais, fatores quimiotáticos, substâncias vaso-ativas, ativação do sistema complemento e conseqüente migração de células inflamatórias mononucleares.

Essas células, basicamente monócitos e linfócitos, estimulam a proliferação de células endoteliais, pericitos e fibroblastos peri-vasculares com aumento de síntese proteica e deposição de colágeno tipo I e fibronectina (HAUSTEIN et alii, 1986).

O fenômeno de Raynaud, tão freqüente e muitas vezes o primeiro sinal desta moléstia, deve também ser considerado na gênese da lesão vascular.

Pela definição de LEWIS e PICKERING (1934) apud RODNAN et alii (1980) o fenômeno de Raynaud se caracteriza por uma constrição intermitente e ativa das pequenas artérias periféricas, com conseqüente redução do fluxo sanguíneo e isquemia. A partir das alterações degenerativas das células endoteliais causadas pela isquemia, desencadeia-se um processo de coagulação, adesividade plaquetária e fenômenos trombóticos, com conseqüente redução da luz e isquemia sucessivamente. Também como conseqüência da hipóxia se observa alteração do metabolismo aeróbico da glicose, resultando em excessiva produção de ácido láctico, que é um ativador da prolil-hidroxilase, enzima que estabiliza a conversão da prolina peptídica em hidroxiprolina no protocólágeno e conseqüente aumento da produção de colágeno (ROADS & HUTTON Jr, 1967).

CAMPBELL & LEROY (1975) enfatizam o sistema vascular como órgão alvo da ES sendo que as lesões vasculares apresentariam três fases: uma inicial inflamatória, com infiltrado mononuclear perivascular e intersticial; uma fase proliferativa fibroblástica; e uma última fase indurativa, caracterizada por intensa esclerose da íntima de pequenas

artérias e do interstício.

Estudos morfológicos e funcionais das alterações vasculares na ES (KAHALEH, 1990), têm identificado injúria e disfunção precoce das células endoteliais que se perpetuam durante o curso da doença. Essas células, por mostrarem um considerável potencial biológico na síntese de moléculas como: fatores de crescimento e citocinas, proteínas de matrix extracelular, fatores anticoagulantes e proteínas vaso ativas, uma vez alteradas, podem desencadear um ambiente de trombose e fibrose.

Segundo esse mesmo autor, a injúria à célula endotelial pode ser mediada por auto-antígenos ou citocinas produzidas por linfócitos ou pelas próprias células endoteliais, que agem localmente ou a distância. As principais citocinas implicadas neste mecanismo são: interleucinas (IL-1 α e β ; IL-2, 3 e 4); fatores de necrose tumoral (TNF α e β); fatores de crescimento derivados das plaquetas e tromboglobinas (DGF, TGF β); interferon γ (IFN γ) e fatores de liberação de heparina (HRF).

A injúria à célula endotelial pode levar à fibrose por vários mecanismos: hipóxia tecidual, pela indução de síntese de fatores de crescimento e pela alteração da permeabilidade vascular, dando acesso aos fatores de crescimento e proteínas plasmáticas no interstício (KAHALEH, 1990).

A estrutura e função do tecido conjuntivo são mantidas por proteínas estruturais como o colágeno, proteoglicanos, fibronectina e por células, especialmente fibroblastos. O balanço entre a síntese e a degradação dessas proteínas é controlado por vários mecanismos reguladores. O

controle negativo da "retroalimentação" pelos produtos de degradação das proteínas estruturais parece ser o caminho decisivo (HAUSTEIN et alii, 1986).

A estimulação do metabolismo dos fibroblastos mediado por citocinas (linfocinas e monocinas) leva a um aumento na velocidade de síntese do colágeno com formação de proteínas incompletas e anormalmente modificadas, as quais são incapazes de exercer suas funções fisiológicas, dentre essas : a manutenção de uma estrutura típica do tecido conjuntivo e a regulação da "retroalimentação" da sua própria síntese (HAUSTEIN et alii, 1986).

A fibronectina é um componente importante do tecido conjuntivo, responsável pela adesão das células na matriz extracelular e pela interação entre elas. Na ES há elevada quantidade de fibronectina ao redor de fibroblastos, capilares e nas áreas fibróticas sintetizadas pelos fibroblastos. A fibronectina e seus peptídeos estimulam a proliferação de fibroblastos, bem como a síntese de colágeno, consolidando seu envolvimento na patogenia desta moléstia (FLEISCHMAJER et alii 1980 a e b, 1981).

CLAMAN (1990) tem alertado sobre o papel importante dos mastócitos na ES, na produção de fatores de crescimento ligados à heparina, os quais se unem aos fatores de crescimento vinculados a fibroblastos e de endoteliócitos, facilitando suas atividades.

Até o momento, um evento primário na patogenia da ES continua desconhecido e é muito pouco provável que apenas um mecanismo seja responsável. Alguns fatores devem ser salientados

e colocados como possíveis desencadeantes: a alta exposição a antígenos específicos, o mimetismo celular a agentes infecciosos, o desbalanço entre linfócitos T, bem como fatores genéticos, hormonais, medicamentosos e ambientais (POSTLETHWAITE, 1990).

Os elementos teciduais ou também chamados "células residentes", principalmente envolvidos nesta lesão, seriam os endoteliócitos, fibroblastos e mastócitos e as células circulantes ou "migrantes" representadas pelos linfócitos, monócitos e plaquetas (CLAMAN, 1990).

A injúria ou disfunção desses elementos celulares acima citados, associados às anormalidades do sistema imune celular e humoral, tão bem demonstradas nesta doença através de uma variedade de mediadores intercelulares (citocinas) e anticorpos produzidos, levariam a um produto final que é a marca desta doença, caracterizado pelas lesões vasculares e fibróticas (POSTHETHWAILE, 1990).

Para melhor compreender esses mecanismos discutidos, ver (Fig. 01).

IMUNIDADE CELULAR**a-LIBERAÇÃO DE CITOCINAS**

→ L
 IL-1 α β
 IL-2; 3e4
 M
 TNF α β
 IFN γ
 HRF

b-LINFOCITOS CITOTÓXICOS**IMUNIDADE HUMORAL**

→ LINFÓCITOS B
 Ac-específicos

e
 Ac-inespecíficos

LESÕES VASCULARES

INJURIA A CELULA ENDOTELIAL
 (TNF; IFN γ ; NK; TGF β ; IL-2; imune-complexos; T citotóxicos)

PROLIFERAÇÃO INTIMAL
 (PDGF; TGF β ; L; IL-1 α β ; M)

FIBROSE DA ADVENTICIA
 (PDGF; TGF β ; L; IL-1 α β ; L; M)

INSTABILIDADE VASCULAR
 (F. Raynaud)

LESÕES FIBRÓTICAS

Alteração biologia fibroblasto

↑QUIMIOTAXIA DOS FIBROBLASTOS
 (TGF β ; IL-4; TNF α β ; PDGF; IFN γ)

↑PROLIFERAÇÃO FIBROBLASTICA
 (TGF β ; IL-1 α β ; PDGF; IFN γ ; L; M;
 TNF α β)

↑COLAGENO
 (TGF β ; IL-1 α β ; IL-4; PDGF; Sc170)

↑GLICOSAMINOGLICANOS
 (TGF β ; IL-1 α β ; IL-4; TNF)

↑FIBRONECTINA
 (TGF β ; IL-4)

LEGENDA: HRF= Fator de liberação de heparina; IFN= Interferon; IL= Interleucina; L=Linfocinas; M= Monocinas; NK= Célula "Killer" natural; PDGF= Fator de crescimento derivado da plaqueta; Sc1-70= Auto anticorpo anti-esclerodermia; TGF= Fator de crescimento ligado a tromboglobina; TNF= Fator de necrose tumoral.

1.3 FORMAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de Esclerodermia depende essencialmente do reconhecimento de suas diferentes formas clínicas.

As formas regionais ou focais, geralmente restritas à pele e de acometimento principalmente em crianças e adultos jovens, são variantes usualmente benignas, mas podem entretanto, algumas vezes evoluir para a forma sistêmica (RODNAN, 1963; WUTBRICH et alii, 1975).

Para LE ROY et alii (1988) a severidade e a progressão da forma sistêmica têm um espectro que vai desde um espessamento cutâneo limitado "Esclerose Sistêmica Limitada" (lSSc), geralmente confinada à esclerose das extremidades : dedos, mãos e algumas vezes o antebraço ou face e evolução prolongada antes da expressão plena das manifestações viscerais, podendo se apresentar com as características da síndrome de CREST (C = Calcinose; R = Fenômeno de Raynaud; E = Disfunção Esofágica; S = Esclerodactilia; T = Telangiectasia) até uma forma mais agressiva em que o espessamento cutâneo é generalizado, difuso "Esclerose Sistêmica Difusa" (dSSc), com dano visceral rapidamente progressivo e fatal.

Segundo MARQUES NETO & SAMARA (1985) a ocorrência de alterações esclerosantes e vasculares em qualquer fase clínica da enfermidade, relacionada ao curso evolutivo e prognóstico, e também ao grupo etário, permite uma classificação geral das formas sistêmicas em dois grupos: inflamatório ou predominantemente vascular e não inflamatório ou predominantemente fibrosante. O primeiro, geralmente mais

precoce, com acometimento de indivíduos de faixa etária mais jovem, apresenta intensas alterações vasculares a nível da pele e vísceras, de modo a definir uma evolução extremamente rápida, sem permitir por vezes a expressão de esclerose cutânea. Já na forma não inflamatória, de incidência mais tardia, a evolução é lenta e arrastada para o comprometimento visceral, com expressão de esclerose cutânea das extremidades e face, podendo progredir para a porção proximal dos membros e tronco.

MARQUES NETO & SAMARA (1985) consideram a acrosclerose e a síndrome de CREST como variantes deste segundo grupo (forma não inflamatória), porém ressaltam que os componentes isolados dessa síndrome podem ocorrer em qualquer fase evolutiva da doença, não se incluindo em nenhuma forma clínica específica.

Embora variáveis os critérios utilizados pelos autores na classificação da forma clínica da ES, pode-se dizer que existe equivalência entre a forma clínica difusa da ES de LE ROY et alii (1988) e a forma clínica tipo inflamatória de MARQUES NETO & SAMARA (1985), bem como em relação à forma clínica limitada da ES de LE ROY et alii (1988) e a forma não inflamatória ou fibrosante de MARQUES NETO & SAMARA (1985).

1.4 CLASSIFICAÇÃO GERAL DA ESCLERODERMIA

(MARQUES NETO & SAMARA, 1985)

I- Formas focais ou regionais

a. Cutâneas

1. Morféia: em placas únicas ou múltiplas

gutata

nodular subcutânea

generalizada

2. Linear: com hemiatrofia de extremidades

com melorreostose

em golpe de sabre: com e sem hemiatrofia facial

b. Viscerais: pulmonar, cardíaca, renal e gastrintestinal

II- Formas Sistêmicas

a. Esclerose Sistêmica tipo inflamatória (de acometimento predominantemente vascular)

b. Esclerose sistêmica do tipo esclerosante (de acometimento predominantemente fibrosante)

c. Síndrome de superposição (esclerodermatomiosite, lupoderma, forma reumatóide) e doença mista do tecido conjuntivo

III - Esclerodermia induzida por elementos químicos: cloreto de polivinil, tricloretileno, bleomicina, pentazolina e sílica.

IV - Fasciíte eosinofílica (Doença de Schulmann)

V - Formas inusitadas : induzidas por enxertos de medula, por estímulos vibratórios (doença dos madeireiros do Canadá)

1.5 DIAGNOSTICO CLINICO

O espessamento cutâneo, a aderência da pele aos tecidos subjacentes e fenômeno de Raynaud são usualmente os aspectos clínicos mais evidentes da ES (D'ANGELO et alii, 1969).

Outras alterações cutâneas comuns no diagnóstico clínico da ES incluem : telangiectasia e úlcera digital.

O envolvimento cutâneo pode ser didaticamente apresentado em três fases seqüenciais: inicial edematosa, indurativa e fase mutilante. A primeira se caracteriza pelo aspecto céreo e suculento da pele das extremidades. A segunda apresenta enrijecimento da pele decorrente da fibrose, com retificação dos relevos cutâneos, acentuadamente na face, que se torna amímica, com teleangiectasias e alterações discrômicas. Na terceira fase há predominância de incapacidade funcional, sobretudo de extremidades, que assumem a conformação "em garra", pela intensificação de esclerose da pele e tendões. Nesta fase, radiologicamente, podem-se encontrar aumento da densidade óptica de partes moles, calcinose e reabsorção de falanges distais (acrosteólise), (MARQUES NETO & SAMARA 1985).

O fenômeno de Raynaud ocorre na maioria dos pacientes com esclerodermia e usualmente precede a doença. É um fenômeno vasospástico, geralmente bilateral, precipitado pelo frio ou "stress" emocional e se caracteriza por: palidez, cianose e hiperemia secundária à vasodilatação (TUFFANELLI, 1989).

Dentre todos os segmentos do trato gastrintestinal, o esôfago é o mais freqüentemente acometido (GARRET et alii, 1971). Também apresenta três fases evolutivas, demonstráveis

radiologicamente como: discinesia, ectasia e retificação das paredes esofágicas.

A pleura, vasos e parênquima pulmonar são atingidos de forma isolada ou associada, sendo que a fibrose intersticial focal ou difusa é a lesão mais característica (25 a 90%), cujo substrato radiológico é o pulmão em favo de mel (MARQUES NETO & SAMARA, 1985).

Anormalidades cardíacas podem ocorrer de 20% a 80% dos pacientes. Podem ser primárias ou secundárias ao comprometimento pulmonar ou renal, sendo a fibrose miocárdica a manifestação mais característica, não relacionada ao estreitamento da luz de pequenas e médias artérias (BULKELLY et alii, 1976).

O envolvimento renal na ES é usualmente uma das últimas manifestações viscerais e a mais relevante no prognóstico, por ser freqüente causa de óbito. As alterações histológicas podem existir mesmo sem nenhuma evidência de disfunção renal (MARQUES NETO, 1984).

1.6 HISTOPATOLOGIA

A pele é o órgão mais freqüentemente envolvido na ES e tem sido objeto de vários estudos a níveis : histoquímico, bioquímico, imunohistoquímico e de microscopia eletrônica (O' LEARY et alii, 1957; FISHER & RODNAN, 1960; FLEISCHMAJER, 1964; FLEISCHMAJER & KROL, 1967; HAYES & RODNAN, 1971; ROWELI & SCOTT, 1975; LOVELL et alii, 1979).

Segundo MARQUES NETO & SAMARA (1985), o envolvimento da pele, representa o grande elemento diagnóstico na doença, evidenciado mediante estudo histopatológico da pele das extremidades.

Os estudos histopatológicos da pele esclerodérmica datam de mais de um século, a partir dos trabalhos de FOERSTER (1861) e KAPOSI (1874) apud RODNAN & BENEDEK (1962), os quais relatam fibrose da derme, atrofia do tecido adiposo do subcutâneo e o encarceramento dos filetes nervosos em tecido conjuntivo hiperplásico. KAPOSI parece ser o primeiro a examinar tecido cutâneo em vida, através de material de biópsia de paciente com ES; enfatizou a presença de numerosos vasos, embora diminuídos de calibre e fortemente envoltos por tecido conjuntivo e coleções de linfócitos peri-vasculares e no interstício.

Os achados microscópicos das alterações cutâneas da ES que mais têm sido enfatizados pelos autores são os seguintes: atrofia da epiderme e seus apêndices, proliferação e homogeneização de bandas colágenas dermo-hipodérmicas, alterações vasculares e infiltrado inflamatório inespecífico (O' LEARY et

alii 1957; FISHER & RODNAN, 1960; FLEISCHMAJER, 1977; RODNAN, 1979 ; LEVER & LEVER, 1990).

Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado alterações que contradizem os achados clássicos. Como exemplo, FLEISCHMAJER et alii (1976) e MORLEY et alii (1985), relatam epiderme de espessura preservada em pacientes comprometidos pela doença em estudos histopatológicos.

Apesar de parecer indiscutível clinicamente, em relação às evidências histológicas seguras da proliferação do tecido conjuntivo colágeno e espessamento do estroma dermo-hipodérmico, bem demonstradas por diversos autores (O'LEARY et alii, 1957; FISHER & RODNAN, 1960; FLEISHMAJER et alii, 1972 ; RODNAN et alii, 1979), existem relatos que não só questionam essa tradicional opinião, como também, defendem que ocorra um decréscimo na espessura da pele e no conteúdo de colágeno nos pacientes com ES (FLEISCHMAJER, 1964; NELDNER et alii, 1966; BLACK et alii, 1970 ; ARHO, 1972).

Há também divergências entre os autores quanto ao nível da proliferação cutânea de fibras colágenas na ES. Para FLEISCHMAJER (1977), a fibrose ocorre em todos os níveis da derme até o subcutâneo. Porém, para REED et alii (1973), o colágeno neoformado aparece na interface dermo-hipodérmica e se estende entre as glândulas e ductos sudoríparos; apenas raramente mostra envolvimento da derme papilar.

FLEISCHMAJER et alii (1972), apresentam evidências de que as alterações da pele na ES, histológicas e ultramicroscópicas, estão principalmente a nível do subcutâneo,

já, FISHER & RODNAN (1960) não fazem referência ao envolvimento do subcutâneo .

O reconhecimento da esclerodermia clássica à luz da microscopia óptica comum não é difícil. Entretanto, um diagnóstico histopatológico definitivo da doença nos seus estágios iniciais, pode ser extremamente difícil, uma vez que o reconhecimento de graus mínimos de proliferação ou homogeneização do colágeno dérmico pode depender de um alto grau de subjetividade e, praticamente, nenhuma especificidade.

No propósito de melhor avaliar as lesões cutâneas da ES, por ser considerada como o grande elemento diagnóstico da doença; levando-se em consideração as várias divergências mencionadas anteriormente em relação aos achados histopatológicos nos vários níveis da pele; no desejo de verificar a consistência das alterações histológicas encontradas e as de maior importância para o diagnóstico da doença nos seus vários estágios de evolução; e, tendo em vista os raros estudos quantitativos na abordagem e avaliação das alterações histológicas da pele nesta doença, fomos motivados, através de metodologia inédita, à realização deste trabalho.

2 OBJETIVOS

1. O estudo comparativo de biópsias de pele de pacientes com ES e controles, no que se refere aos seguintes aspectos histopatológicos:

A - Avaliação da epiderme quanto:

- a. Atrofia;
- b. Retificação;
- c. Distúrbio de pigmentação melânica.

B - Avaliação da derme e hipoderme quanto:

- a. Proliferação de fibras colágenas;
- b. Atrofia de anexos;
- c. Alteração de vasos;
- d. Presença de infiltrado inflamatório.

2. A correlação dos principais achados histopatológicos entre si e em relação a parâmetros clínicos da doença, tais como:

- a. Idade;
- b. Peso;
- c. Tempo de doença;
- d. Forma clínica;
- e. Estadiamento clínico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram estudados 48 doentes com ES, acompanhados no ambulatório da Disciplina de Reumatologia da FCM-UNICAMP, sendo 5 deles pertencentes ao ambulatório de Reumatologia da FM-PUCCAMP. Quarenta e dois doentes eram do sexo feminino e 6 do sexo masculino, sendo todos adultos com idade variando entre 21 e 71 anos, com média de 48 anos. Em relação ao grupo étnico, os doentes eram da raça branca, exceto 4 da raça negra. O tempo de doença variou entre 0,5 e 26 anos, com média de 7,96 anos e o peso observado foi de 39 a 95 Kg, sendo que o peso médio foi de 57,84 Kg. Dentre os doentes, 30 (62,5%) eram virgens de tratamento específico para ES e 18 (37,5%) já haviam se utilizado de algum tipo de medicamento prévio, porém sem nenhum tratamento na vigência da realização da biópsia. Eles eram normotensos, exceto sete acometidos por hipertensão essencial benigna controlada.

O estudo dos casos controle foi realizado em 16 indivíduos voluntários e cadáveres, obedecendo a mesma faixa etária, sexo e peso dos doentes em estudo. Todos eram normotensos, sem doença dermatológica ou doença sistêmica com repercussão para pele.

Caracterização casuística se encontra no quadro a seguir:

QUADRO 3.1 CARACTERIZAÇÃO CASUÍSTICA

	DOENTES	CONTROLES
N	48	16
SEXO	42 F(82,5%) 6 M(12,5%)	14 F(82,5%) 2 M(12,5%)
COR	44 B 4 N	16 B
IDADE*	21-70 (48)	20-80 (45,68)
PESO**	39-95Kg (57,84)	40-73Kg (55,7)

* (t = 0,61 ; GL = 62 ; 0,50 < p < 0,60)

** (t = 0,56 ; GL = 57 ; 0,50 < p < 0,60)

3.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Todos os pacientes foram analisados quanto à forma e estadiamento clínico pela Disciplina de Reumatologia da FCM-UNICAMP, segundo classificação padronizada e adotada por esse serviço (MARQUES NETO & SAMARA, 1985), a saber:

3.2.1 FORMA CLÍNICA DA ES

- a. Esclerose Sistêmica Inflamatória (dSSc*)
- b. Esclerose Sistêmica não Inflamatória (lSSc*)

*Correspondente à forma difusa (dSSc) e à forma limitada (lSSc) da ES na classificação americana de Le Roy et alii (1988).

Foram abolidos do estudo todos os pacientes com síndrome de superposição ou viragem (esclerodermatomiosite, lupoderma, forma reumatóide) e doença mista do tecido conjuntivo.

3.2.2 ESTADIAMENTO CLINICO

O estadiamento clínico foi avaliado segundo a presença e a extensão do comprometimento cutâneo, vascular e visceral em cinco estágios:

- 1- Acroesclerose simétrica com/sem fenômeno de Raynaud.
- 2- Idem e microulceração e/ou acrosteólise.
- 3- Idem e esclerose da pele do tronco e/ou comprometimento esofágico.
- 4- Idem e comprometimento pulmonar.
- 5- Idem e comprometimento renal.

O comprometimento cutâneo e vascular foram avaliados pelo exame clínico dos doentes. A presença de acrosteólise foi observada através do exame radiológico das extremidades superiores e o comprometimento esofágico foi analisado através de esofagograma e/ou esofagomanometria. A avaliação pulmonar foi realizada através de Rx do tórax e provas ventilatórias de função pulmonar, e a função renal através do clearance da creatinina e cintilografia excretora renal (renograma dinâmico).

3.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLOGICA

Os fragmentos de pele dos doentes e dos controles foram obtidos através de biópsia cutânea da face dorsal da terceira falange proximal direita. Esta região topográfica é adotada na realização das biópsias, de acordo com o protocolo utilizado pela disciplina de Reumatologia FCM-UNICAMP, uma vez que a maior expressão da doença (esclerose da pele), inicia o comprometimento cutâneo, com curso de progressão centrípeto, a partir das extremidades, na maioria dos casos. A face dorsal é preconizada por ser menos sujeita a alterações secundárias a atrito.

Os fragmentos, previamente fixados em formalina a 10% eram processados para inclusão e cortes em parafina, com micrótomo ajustado em sete micrômetros. As colorações utilizadas foram: H&E (hematoxilina e eosina) que é a coloração de rotina histológica; reação do PAS (ácido periódico e reativo de SCHIFF) para evidenciar as membranas basais e glândulas sudoríparas; FONTANA MASSON (nitrato de prata amoniacal) para investigação da pigmentação melânica (substância argentafin); WEIGERT- VAN GIESON (fucsina-resorcina e fucsina ácida) para demonstração das fibras elásticas, colágenas e musculares lisas no estudo das lesões vasculares, complementada pela coloração de TRICROMIO DE MASSON (hematoxilina férrica de WEIGERT, escarlate de BIEBRICH e azul de anilina), por fornecer um bom contraste entre fibras colágenas e fibras musculares.

3.3.1 EPIDERME

3.3.1.1 AVALIAÇÃO DA EPIDERME QUANTO À ATROFIA

Esta avaliação foi realizada através da medida da espessura da epiderme em 20 pontos ao longo da mesma, a partir da membrana basal até o bordo inferior do extrato granuloso no plano vertical (MARKS,1981), sendo 10 tomadas a nível da epiderme na porção supra-papilar (NIVEL 1) e as outras 10 a nível do cone epitelial (NIVEL 2), (fig. 02). O valor considerado era o resultado da média aritmética entre as medidas tomadas, em cada nível distinto. somente foram utilizados os cortes totalmente perpendiculares. As mensurações foram feitas através de ocular milimetrada Kpl-W 10x/18 Carl Zeiss, em aumento de 40x (objetiva), em cortes corados pela reação do PAS. Os valores observados foram convertidos em micrômetros.

3.3.1.2 A AVALIAÇÃO DA EPIDERME QUANTO À RETIFICAÇÃO

A retificação da epiderme foi avaliada através da medida da sua extensão (Fig. 03), mensurada em uma distância padrão de 3mm (viável para todos os fragmentos), sendo 1,5mm à direita e 1,5mm à esquerda a partir do centro do fragmento, na membrana basal epidérmica. Utilizaram-se apenas os cortes totalmente perpendiculares. As mensurações eram realizadas através de uma ocular milimetrada Kpl-W 10x /18 Carl Zeiss em aumento de 6,3x (objetiva) e em cortes corados pela reação do PAS. A retificação de um cone epitelial foi somente considerada quando a medida de sua base era maior que a sua altura . O valor considerado era a soma dos valores obtidos à direita e à esquerda da distância preconizada.

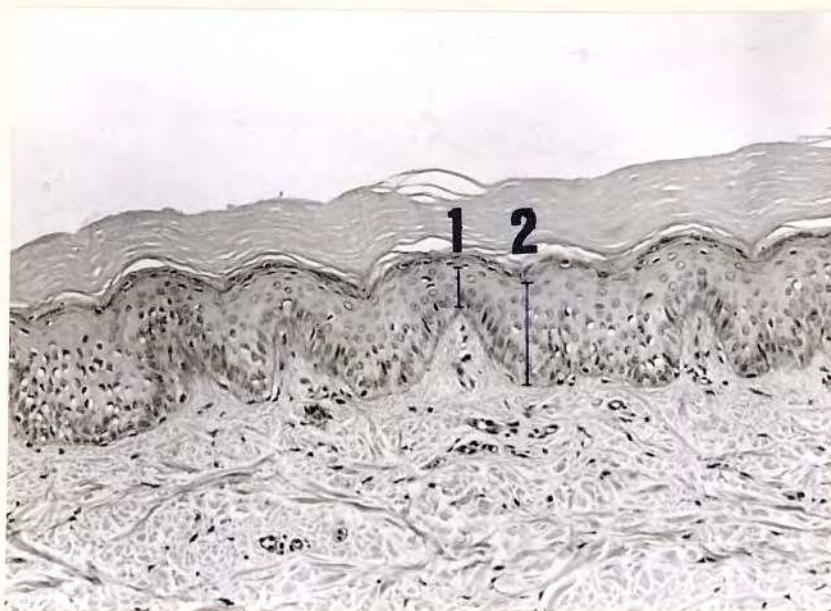


Fig. 02 Avaliação da epiderme quanto à atrofia.
 Epiderme supra-papilar (NIVEL 1), 38,45 μm .
 Cone epitelial (NIVEL 2), 103,36 μm .
 Controle nº 01 (PAS, 133X).

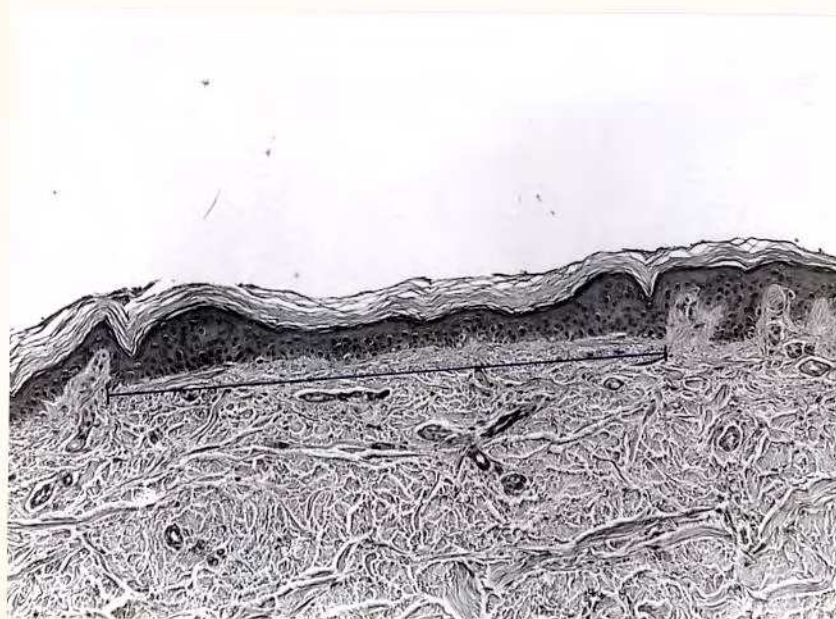


Fig. 03 Avaliação da epiderme quanto à retificação.
 _____ = 0,66mm.
 Controle nº 09 (PAS, 106X).

3.3.1.3 DISTÚRPIO DE PIGMENTAÇÃO MELÂNICA

Na análise da epiderme quanto ao distúrbio de pigmentação melânica foram reconhecidas áreas de hiperpigmentação, áreas de hipopigmentação ou mesmo sem pigmento (amelanóticas).

O distúrbio de pigmentação melânica foi considerado positivo (ou presente) quando a pigmentação era heterogênea (fig. 04) e a extensão da área comprometida deveria compreender no mínimo a camada basal correspondente ao ápice de um cone epitelial e a região supra-papilar contígua. Na vigência de um segmento retificado da epiderme, a extensão da área com distúrbio de pigmentação deveria ser maior ou igual a 100 μ m (valor médio correspondente à soma do ápice de um cone e a porção supra-papilar epidérmica). Esses limites foram considerados e baseados em pequenas variações de pigmentação, caracterizadas em geral por maior concentração de pigmento melânico, principalmente no ápice dos cones epiteliais presentes nos controles, sendo que, nenhum deles ultrapassou esses valores (fig. 05).

O distúrbio de pigmentação melânica foi considerado negativo (ou ausente) quando a pigmentação era homogênea em toda a extensão da camada basal do fragmento analisado, ou se o distúrbio atingisse dimensões menores que as pré-estabelecidas acima. Utilizou-se de cortes corados pela técnica de Fontana Masson e todos os fragmentos foram considerados para estudo, independentes da raça do indivíduo, servindo como controle o seu próprio fragmento, uma vez que a pigmentação é uma condição genética e individual não sendo possível portanto, uma análise

comparativa do doente com um controle, mesmo que eles fossem de uma mesma raça. Também não seria possível avaliação comparativa da pigmentação com espécime de biópsia contralateral, pois o comprometimento cutâneo na ES geralmente é bilateral.



Fig. 04 Distúrbio de pigmentação presente (positiva).
 Areas de hiperpigmentação, hipopigmentação e
 amelanóticas. Doente nº 15 (Fontana Masson, 83X).

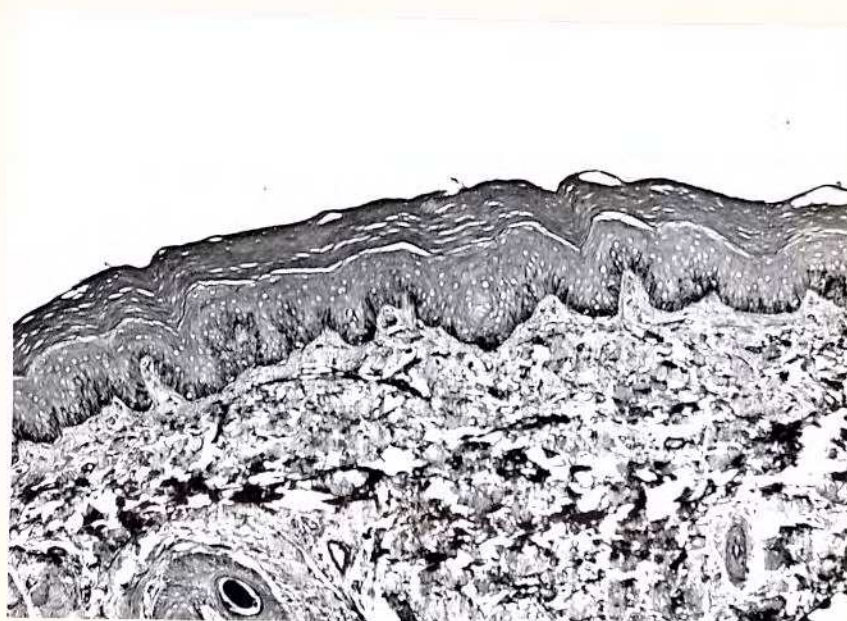


Fig. 05 Distúrbio de pigmentação ausente (negativo).
 Pigmentação melânica homogênea na camada basal
 epidérmica. Controle nº 01 (Fontana Masson, 83X).

3.3.2 DERME E HIPODERME

3.3.2.1 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS

Esta avaliação foi feita através de dois métodos:

3.3.2.1.1 MÉTODO QUANTITATIVO

Foi realizado através da contagem de pontos, toda vez que a interseção de duas linhas correspondesse à fibras colágenas, utilizando-se de uma ocular quadriculada Kpl 8x Carl Zeiss em aumento de 6,3x (objetiva) em cortes corados em H&E. O fragmento era centralizado a fim de que o gradeado atingisse a derme e hipoderme a partir da derme imediatamente abaixo do ápice dos cones epiteliais. A contagem no gradeado foi dividida em três terços: superior, médio e inferior, com um total de 342 pontos de interseção, sendo 114 pontos para cada terço (Fig. 06).

Foram abolidos do estudo todos os pacientes cuja biópsia não continha hipoderma.

Foi considerada a contagem do terços superior e médio, e não do terço inferior, naqueles casos em que o fragmento de biópsia continha todas as camadas da pele, inclusive o hipoderma, porém o material não preenchia integralmente o gradeado no terço inferior.

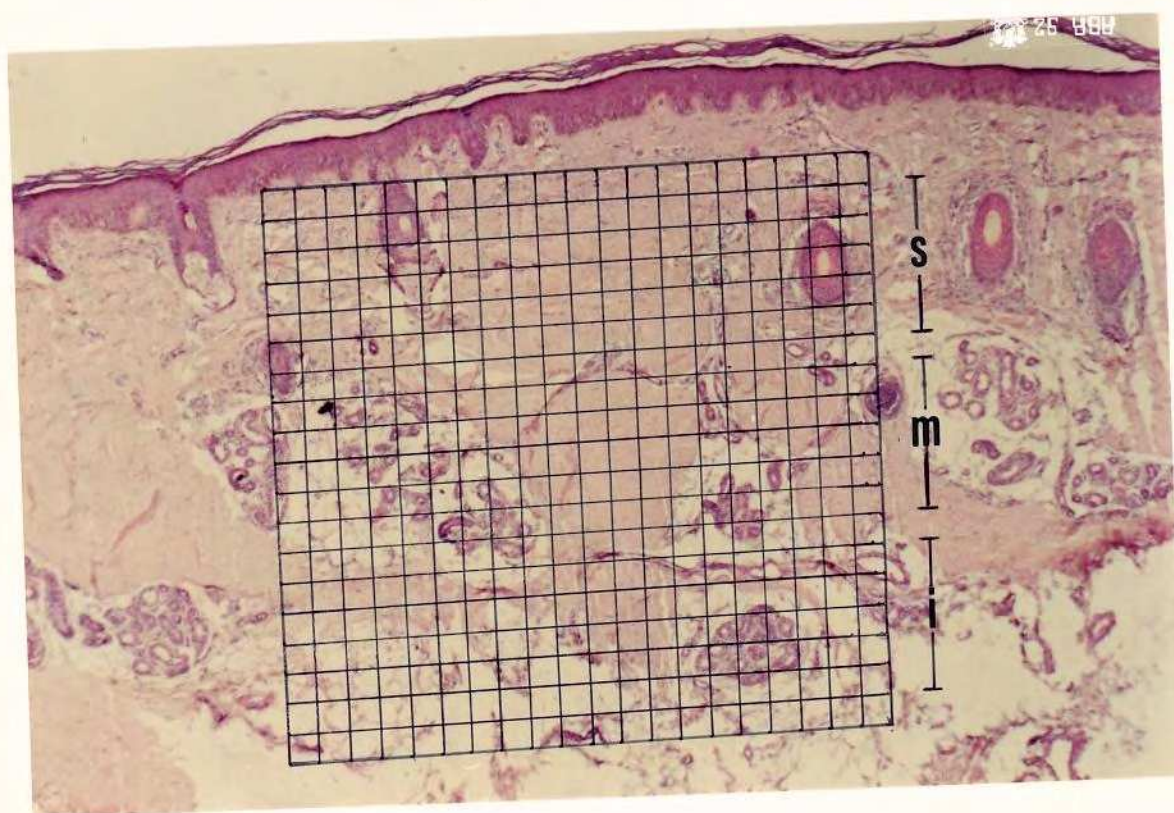


Fig. 06 Proliferação de fibras colágenas (Método quantitativo). Gradeado esquemático para contagem de pontos nos terços: superior (s), médio (m) e inferior (i). Era considerado presente toda vez que a interseção de duas linhas correspondesse à fibras colágenas. Doente n^o 38 (H&E, 46X).

3.3.2.1.1 MÉTODO QUALITATIVO

Esse método baseou-se na análise subjetiva da intensidade de proliferação colágena dermo-hipodérmica atribuindo-se valores em graus (AMSTALDEN et alii, 1989), como se segue:

- grau zero - ausência de proliferação colágena aparente;
- grau I - mínima ou leve proliferação de fibras colágenas;
- grau II - proliferação nítida e moderada de fibras colágenas com redução do manto adiposo peri-glandular sudoríparo;
- grau III - intensa proliferação de fibras colágenas com total ou quase total substituição do tecido adiposo peri-glandular sudoríparo e hipodérmico.

Foram realizadas duas leituras consecutivas para verificar a reprodutibilidade do método intra-observador, utilizando-se das lâminas dos doentes misturadas com as dos controles e com identificação vedada (figs: 07 a 10).



Fig. 07. Ausência de proliferação colágena aparente (grau zero).
Septos fibro-cojuntivos inter-lobulares no hipoderma.
Controle nº 11 (H&E, 33X).

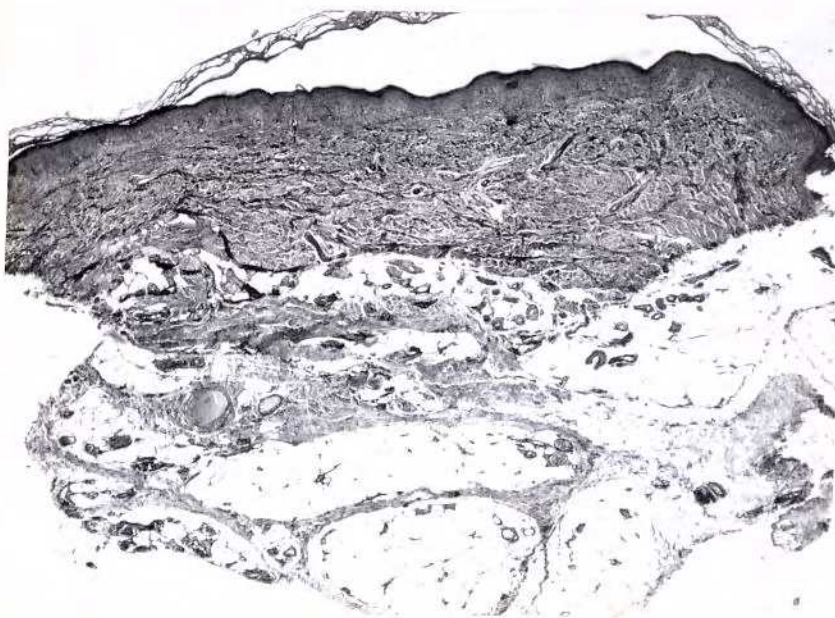


Fig. 08. Proliferação de fibras colágenas leve (grau I).
Doente nº 31 (H&E, 33X).



Fig. 09. Proliferação moderada de fibras colágenas (grau II). Redução do tecido adiposo envolvente às glândulas sudoríparas. Doente nº 38 (H&E, 33X).

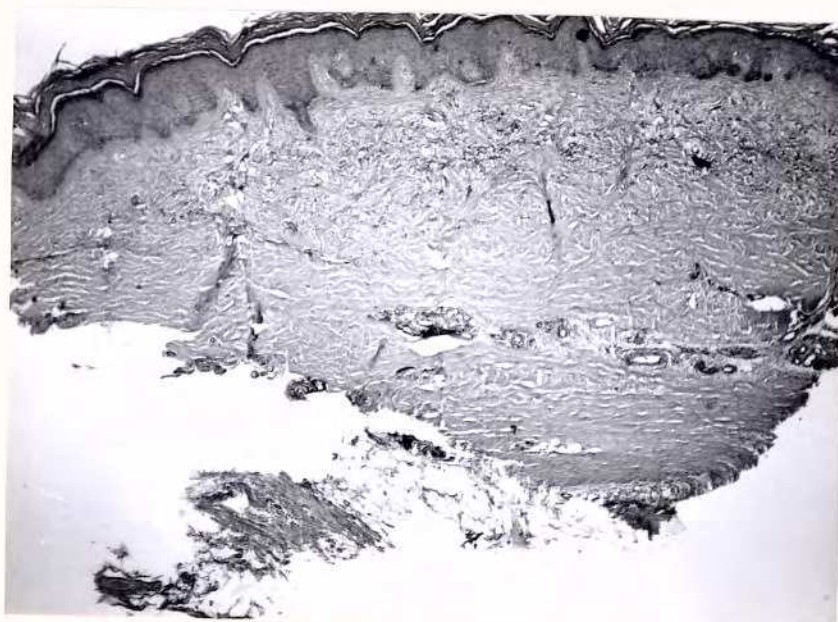


Fig.10. Intensa proliferação de fibras colágenas (grau III). Substituição completa do tecido adiposo peri-anexial sudoríparo e hipodérmico. Doente nº 18 (H&E, 33X).

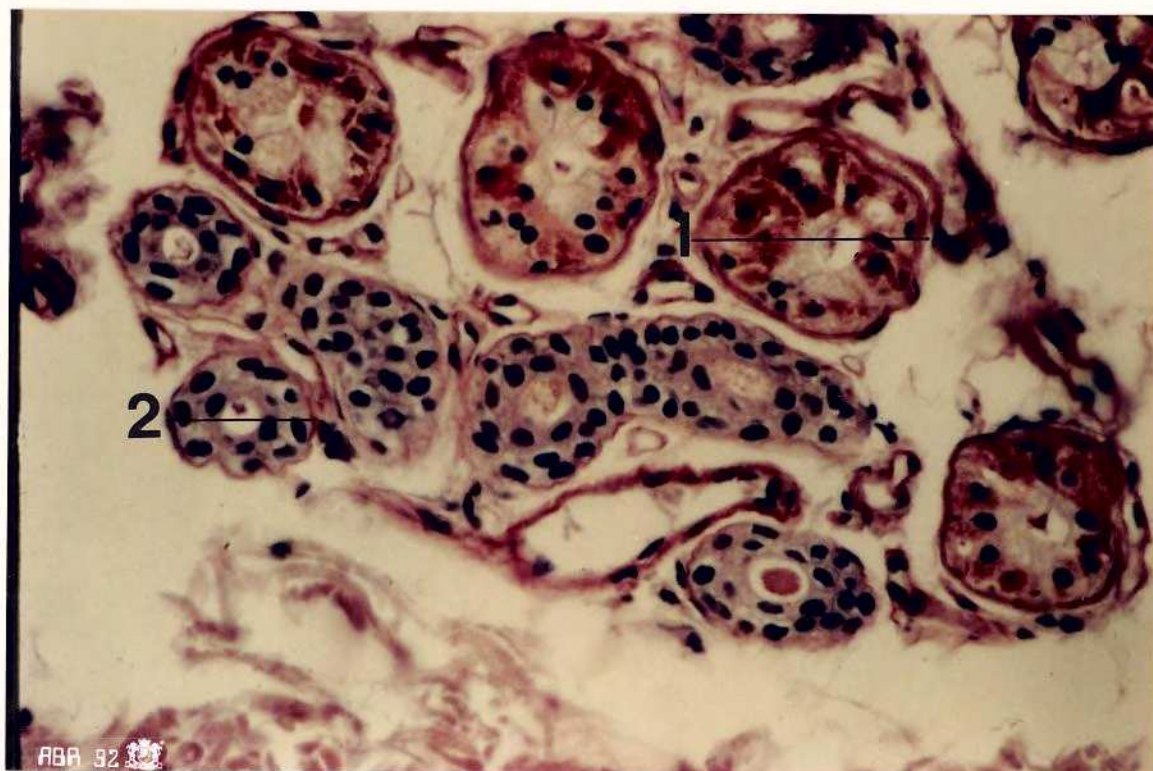


Fig. 11 Medida do diâmetro das glândulas sudoríparas.
1- Porção secretora: 60,09 μm .
2- Porção ductal: 36,05 μm .
Doente nº 25 (PAS, 460X).

3.3.2.2 ATROFIA DE ANEXOS

A avaliação da derme e hipoderme quanto à atrofia de anexos foi realizada através da medida do diâmetro das glândulas sudoríparas em dois níveis da mesma, um a nível da porção secretora e outro na porção ductal contígua.

Utilizou-se de uma ocular milimetrada Kpl-W 10x/18 Carl Zeiss, em aumento de 40x (objetiva) e em cortes corados pela reação do PAS. Foi considerado como referencial para se medir o diâmetro dessas estruturas, a membrana basal (limite mais externo), fortemente corada por essa reação (fig.11). O resultado aceito era a média aritmética dos valores obtidos e transformados em micrômetros.

Foram considerados para cada caso a medida de um mínimo de 10 estruturas correspondentes à porção secretora e outras 10 correspondentes à porção ductal das glândulas sudoríparas, sempre em corte o mais transversal possível em relação à parede, com realização de cortes seriados e aprofundados quando necessário. O resultado considerado foi a média aritmética dos valores obtidos e transformados em micrômetros. Não foram computados os casos que não apresentaram número suficiente dessas estruturas em cortes transversais.

A distinção entre porção secretora e porção ductal foi facilmente obtida em cortes corados pela reação do PAS, fortemente positiva, apenas no citoplasma das células epiteliais da porção secretora das glândulas (tanto nas células claras ricas em glicogênio como nas células escuras secretoras de sialomucina, ricas em mucopolissacárides), sendo ausente nas células epiteliais da porção ductal (fig. 11).

3.3.2.3 ALTERAÇÃO DE VASOS

A análise dos vasos se baseou na observação da presença e tipo de lesão histopatológica. Foram avaliadas todas as artérias de pequeno ou médio calibre presentes nos fragmentos e arteríolas de até 50 μm , em cortes corados pela técnica de WEIGERT- VAN GIESON. Utilizou-se da técnica de TRICRÔMIO DE MASSON, para complementar o estudo das alterações vasculares, nos fragmentos com lesão vascular presente. Também foi avaliado o grau de estreitamento da luz dos vasos, atribuindo-se valores de 1 a 3, correspondentes às seguintes intensidades: grau 1 leve (até 33%), grau 2 moderada (até 66%) e grau 3 intensa (> 66%). Para essa avaliação em cada caso, foram consideradas as seções transversais com maior grau de estreitamento, assumindo que a lâmina elástica interna representa aproximadamente o limite do lúmen original.

3.3.2.4 INFILTRADO INFLAMATORIO

Esta avaliação se baseou na constatação da presença do infiltrado inflamatório, no seu padrão histológico, tipo celular e elementos predominantes, intensidade e distribuição, utilizando-se cortes corados em H&E.

3.3.3 METODOLOGIA ESTATISTICA

Foi realizado estudo de comparação de médias, utilizando-se do teste t de Student quando haviam até duas amostras, e análise da variância, quando as amostras a serem comparadas eram mais que duas, aplicando-se nesta, o teste de Tukey se a diferença fosse significativa.

Também foi realizado correlação de associação, utilizando-se dos métodos de : correlação simples, qui-quadrado e teste exato de Fisher, conforme o caso.

O estudo estatístico foi considerado significativo somente com valor de $p < 0,05$.

Legendas utilizadas:

DP = desvio padrão;
F = F de Snedecor;
GL = graus de liberdade;
M = média;
n = número de casos;
p = probabilidade;
QM = quadrado médio;
r = correlação simples;
SQ = soma dos quadrados;
t = teste t de Student;
 χ^2 = teste do qui-quadrado;
 χ^2_{cor} = teste do qui-quadrado com fator de correção.

4 RESULTADOS E TABELAS

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Na tabela nº 01 observam-se os valores obtidos quanto à idade, sexo, tempo de doença, peso, forma e estadiamento clínico em relação aos doentes e na tabela nº 02 são demonstrados os valores constatados quanto à idade, sexo e peso em relação aos controles. Não foi possível obter o peso em três doentes e em dois controles.

A avaliação dos doentes quanto à forma clínica da ES, demonstrou 27 doentes na forma inflamatória e 21 na forma não inflamatória.

Quanto ao estadiamento clínico observou-se o seguinte:

Estádio 1 = 4 doentes

Estádio 2 = 4 doentes

Estádio 3 = 22 doentes

Estádio 4 = 18 doentes

Estádio 5 = nenhum

TABELA 01 Valores observados em relação à idade, sexo, tempo de doença, peso, forma e estadiamento clínico, nos doentes.

D (n)	IDADE (anos)	SEXO	TEMPO DOENÇA (anos)	PESO (Kg)	FORMCLIN	ESTADCLIN
1	66	F	15	65	NAO INFL	3
2	49	F	1	43	INFLAMAT	3
3	59	F	9	65,9	NAO INFL	3
4	44	F	18	60	INFLAMAT	4
5	61	F	15	68,5	NAO INFL	3
6	57	F	16	47,8	NAO INFL	1
7	61	F	11	53,5	NAO INFL	2
8	61	F	6	54,5	NAO INFL	3
9	33	F	8	41,3	INFLAMAT	4
10	69	F	10	54,2	NAO INFL	2
11	47	M	0,58	61,4	INFLAMAT	3
12	34	F	3	46,6	INFLAMAT	3
13	47	F	1,5	43	INFLAMAT	4
14	48	F	25	78,8	NAO INFL	3
15	45	F	1	61,2	INFLAMAT	4
16	40	F	3	66	INFLAMAT	3
17	49	F	10	56,5	INFLAMAT	4
18	51	M	1	47,6	INFLAMAT	3
19	60	M	2	54,7	NAO INFL	3
20	71	M	7	54	NAO INFL	3
21	58	F	13	79,4	NAO INFL	1
22	63	M	0,5	40	INFLAMAT	3
23	33	F	6	-	INFLAMAT	3
24	46	F	11	51,8	INFLAMAT	4
25	28	F	12	51,4	INFLAMAT	2
26	38	F	10	55,7	INFLAMAT	3
27	54	F	0,75	78,5	INFLAMAT	4
28	21	F	6	63,6	INFLAMAT	4
29	65	F	26	39	NAO INFL	4
30	30	F	10	-	INFLAMAT	3
31	43	F	0,83	56,4	NAO INFL	1
32	43	F	3	91,7	INFLAMAT	3
33	60	F	1	-	NAO INFL	3
34	53	F	10	95	INFLAMAT	4
35	42	F	10	57	INFLAMAT	4
36	25	F	8	52,2	INFLAMAT	4
37	45	F	3,3	64,2	INFLAMAT	4
38	30	F	1	41,3	INFLAMAT	1
39	39	F	2	65,4	INFLAMAT	4
40	49	F	12	64	NAO INFL	4
41	57	F	10	45,5	NAO INFL	3
42	40	F	1	64,5	INFLAMAT	4
43	58	F	16	63	NAO INFL	4
44	37	F	0,75	54,4	INFLAMAT	3
45	49	M	5	61,3	NAO INFL	3
46	49	F	14	53,5	NAO INFL	3
47	59	F	24	42,9	NAO INFL	4
48	40	F	2	48	NAO INFL	2

TABELA 02 Valores observados em relação à idade, sexo e peso, nos controles.

C (n)	IDADE (anos)	SEXO	-	PESO (Kg)
1	20	F		55
2	26	F		60
3	32	F		64
4	36	F		73
5	38	F		70
6	40	F		42
7	40	F		64,5
8	41	F		-
9	42	M		58
10	46	F		-
11	51	F		53,7
12	53	F		40,5
13	56	F		69
14	62	F		40
15	68	F		43,1
16	80	M		47

LEGENDA -Tabelas (01 e 02): (C)= controles (D)=doentes; ESTADCLIN = estadiamento clínico ; FORMCLIN = forma clínica; INFLAMAT = inflamatória e NAO INFL = não inflamatória.

4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLOGICA

Observam-se os valores obtidos nos doentes (tab. 03) e nos controles (tab. 04) nas seguintes modalidades: espessura de epiderme (níveis 1 e 2); extensão da retificação da epiderme; presença ou ausência de distúrbio de pigmentação; diâmetro das glândulas sudoríparas (porção secretora e porção ductal) e presença de infiltrado inflamatório. Nas tabelas: nº 05 (doentes) e nº 06 (controles) observam-se os valores obtidos quanto à proliferação de fibras colágenas: método quantitativo (nos diferentes terços: superior; médio; inferior e em toda a espessura) e método qualitativo (leituras: 1 e 2) e presença de lesão vascular.

Não foi possível medir a espessura da epiderme e a retificação em sete doentes, devido aos cortes não se apresentarem totalmente perpendiculares. Em nove doentes foi considerada a avaliação da proliferação de fibras colágenas, pelo método quantitativo, apenas no terço superior e médio, e não no terço inferior e em toda a espessura, pois os fragmentos não preenchiam completamente o gradeado no terço inferior em objetiva preconizada de 6,3x. Também não foi considerado o valor do diâmetro das glândulas sudoríparas (porção secretora) em sete doentes e dois controles, pois não preenchia o critério necessário de um mínimo de dez glândulas em cortes transversais. O mesmo ocorreu com nove doentes em relação ao diâmetro da porção ductal.

TABELA 03 Valores observados quanto a espessura, retificação e distúrbio de pigmentação epidérmicos, diâmetros: secretor e ductal sudoríparos e presença de infiltrado inflamatório, nos doentes.

D	ESPEPID-1	ESPEPID-2	RETIF	DISTPIG	DIASECR	DIADUCT	INFLAM
(n)	(μ m)	(μ m)	(μ m)		(μ m)	(μ m)	
1	38,94	71,15	1,49	sim	46,87	23,31	não
2	36,29	85,36	1,15	não	-	-	sim
3	-	-	-	sim	37,01	23,70	não
4	44,95	85,33	1,00	sim	38,70	27,44	não
5	35,09	83,89	0,83	sim	43,99	-	não
6	41,10	78,36	1,68	sim	45,43	32,21	sim
7	46,39	62,98	2,17	sim	-	-	não
8	44,95	94,23	1,59	não	44,23	30,52	não
9	50,96	70,43	1,95	não	49,51	23,55	sim
10	38,70	70,43	1,52	sim	-	-	não
11	38,70	63,70	1,63	sim	43,99	31,00	sim
12	44,47	77,16	1,52	não	45,67	31,49	não
13	33,87	82,28	0,87	sim	32,69	27,16	não
14	-	-	-	sim	-	-	não
15	47,35	86,77	1,49	sim	42,54	-	não
16	47,59	139,63	0,80	não	45,43	32,45	não
17	52,40	94,23	1,26	sim	45,89	28,84	não
18	39,66	100,00	1,05	sim	33,65	23,07	não
19	46,39	78,60	2,20	não	-	-	não
20	44,47	88,94	0,45	não	47,11	27,64	sim
21	45,49	86,29	1,14	não	44,71	30,52	não
22	42,30	100,72	0,63	sim	45,67	29,56	sim
23	44,23	72,83	2,26	não	35,57	27,64	não
24	-	-	-	não	39,66	25,96	não
25	37,01	82,21	1,66	sim	49,03	33,89	não
26	-	-	-	não	48,31	31,97	não
27	47,35	94,71	0,51	não	39,52	24,03	não
28	37,98	87,74	0,57	sim	38,94	29,93	não
29	-	-	-	não	48,55	26,20	sim
30	47,11	88,70	0,74	não	32,20	26,44	não
31	43,26	76,20	1,48	não	43,99	27,88	não
32	34,13	94,23	1,15	sim	-	-	não
33	34,37	92,54	1,09	sim	41,10	23,55	não
34	51,20	110,57	0,75	sim	47,59	33,17	não
35	42,54	93,50	0,86	não	40,14	25,48	não
36	36,29	75,83	0,38	sim	35,57	24,51	não
37	46,15	120,91	0,75	sim	43,26	27,64	não
38	59,13	124,47	2,08	sim	41,34	23,31	sim
39	-	-	-	não	40,38	30,04	não
40	43,26	89,42	1,17	sim	39,90	25,24	não
41	46,15	99,75	2,22	não	43,02	31,00	não
42	52,64	126,68	1,20	não	39,42	31,73	sim
43	34,37	66,10	1,14	sim	40,06	25,48	não
44	51,68	107,21	0,62	não	36,77	23,55	não
45	69,95	120,19	2,17	sim	38,94	-	não
46	38,70	62,25	2,02	sim	35,09	24,51	não
47	49,03	87,98	2,85	não	41,58	24,75	não
48	-	-	-	não	-	31,25	não.

TABELA 04 Valores observados quanto à espessura, retificação e distúrbio de pigmentação epidérmicos, diâmetros: secretor e ductal sudoríparos e a presença de infiltrado inflamatório, em relação aos controles.

C (n)	ESPEPID-1 (μ m)	ESPEPID-2 (μ m)	RETIF (μ m)	DISTPIG	DIASECR (μ m)	DIADUCT (μ m)	INFLAM
1	47,11	100,24	0,48	não	38,22	33,89	não
2	34,85	73,55	1,57	não	42,30	30,76	não
3	31,97	80,04	0,54	não	34,85	23,55	não
4	39,66	107,08	0,34	não	44,71	30,04	não
5	47,83	108,17	2,01	não	-	24,03	não
6	39,66	75,21	1,54	não	41,58	27,88	não
7	58,65	98,79	1,34	não	45,43	27,64	não
8	56,00	95,67	1,28	não	46,15	25,48	não
9	28,12	49,75	1,52	não	50,24	33,17	não
10	56,25	81,73	1,49	não	-	26,92	não
11	44,23	70,19	1,00	não	39,90	26,92	não
12	37,74	77,40	0,94	não	48,07	32,93	não
13	31,97	63,70	2,37	não	40,14	29,32	não
14	39,18	59,37	1,29	não	36,77	31,49	não
15	22,83	46,39	2,20	não	40,38	24,27	não
16	29,80	57,93	2,05	não	43,87	27,40	não

LEGENDA - TABELAS (03 e 04): (C)= controles; (D)= doentes; DIADUCT= diâmetro da porção ductal sudorípara; DIASECR= diâmetro da porção sudorípara secretora; DISTPIG= distúrbio de pigmentação melânica; ESPEPID 1 e 2 = espessura da epiderme nível :1 e nível: 2 ; INFLAM= infiltrado inflamatório; (μ m)= micrômetro; RETIF= retificação da epiderme.

TABELA 05 Valores observados quanto à proliferação de fibras colágenas (métodos: quantitativo e qualitativo) e presença de lesão vascular, em relação aos doentes.

n(D)	PFC-SUP	PFC-MED	PFC-INF	PFC-TOT	PRCOL-1	PRCOL-2	LESVAS
1	88	25	47	160	I	I	SIM
2	102	54	-	-	II	II	SIM
3	114	63	29	206	II	I	NAO
4	114	91	65	270	III	II	SIM
5	110	94	58	262	II	II	SIM
6	110	34	35	179	I	I	-
7	113	41	14	168	I	I	SIM
8	96	18	52	166	0	0	SIM
9	87	36	29	152	I	I	SIM
10	114	71	52	237	III	III	SIM
11	111	84	69	264	II	I	SIM
12	105	33	32	170	I	I	NAO
13	99	43	33	175	III	III	NAO
14	110	45	-	-	I	I	NAO
15	114	77	24	215	II	II	-
16	113	60	-	-	II	II	-
17	106	31	48	185	I	I	NAO
18	110	102	93	305	III	III	SIM
19	114	111	61	286	III	III	SIM
20	104	113	85	302	II	II	SIM
21	103	36	28	167	I	I	NAO
22	98	83	59	240	II	II	SIM
23	110	89	48	247	I	II	-
24	112	81	-	-	III	III	SIM
25	100	61	36	197	I	I	SIM
26	97	70	25	192	II	II	SIM
27	112	6	34	152	I	I	SIM
28	108	57	27	192	I	0	-
29	114	77	102	293	III	III	SIM
30	104	66	17	197	I	I	SIM
31	105	60	27	192	II	II	NAO
32	114	54	5	173	I	I	SIM
33	85	44	48	177	I	I	-
34	108	58	24	190	I	I	-
35	105	57	22	184	I	II	NAO
36	103	65	50	218	II	II	SIM
37	109	87	67	263	III	III	SIM
38	97	89	47	233	II	II	SIM
39	110	48	9	167	I	I	-
40	93	79	-	-	II	I	NAO
41	87	54	-	-	I	I	-
42	112	33	16	161	I	I	SIM
43	87	55	48	190	II	II	NAO
44	114	67	-	-	I	II	-
45	112	102	-	-	II	III	NAO
46	89	40	-	-	0	0	-
47	111	81	38	230	II	I	SIM
48	114	66	-	-	0	0	NAO

TABELA 06 Valores observados quanto à proliferação de fibras colágenas (métodos : quantitativo e qualitativo) e presença de lesão vascular, em relação aos controles.

n(C)	PFC-SUP	PFC-MED	PFC-INF	PFC-TOT	PRCOL-1	PRCOL-2	LESVAS
1	101	42	23	166	I	0	NAO
2	109	71	21	201	0	0	NAO
3	114	49	18	181	0	0	NAO
4	112	78	2	192	0	0	NAO
5	114	66	5	185	0	0	NAO
6	110	48	4	162	0	0	NAO
7	113	44	27	184	I	I	NAO
8	112	28	1	141	0	0	NAO
9	101	41	13	155	0	0	NAO
10	104	56	17	177	I	I	NAO
11	104	22	7	133	0	0	NAO
12	64	1	14	79	0	0	NAO
13	83	27	21	131	0	0	NAO
14	62	5	5	72	0	0	NAO
15	103	24	9	136	0	0	NAO
16	100	57	15	172	0	0	NAO

LEGENDA -(TABELAS: 05 e 06): n(C) = número do controle;
n(D) = número do doente; LESVAS = lesão vascular;
Contagem de pontos (método quantitativo) da: PFC-INF =
proliferação de fibras colágenas no terço inferior; PFC-MED =
proliferação de fibras colágenas no terço médio; PFC-SUP =
proliferação de fibras colágenas no terço superior; PFC-TOT =
proliferação de fibras colágenas em toda espessura; Avaliação em
graus (de 0 a III - método qualitativo) da:
PRCOL-1 = proliferação de fibras colágenas - leitura 1;
PRCOL-2 = proliferação de fibras colágenas - leitura 2.

4.2.1 ATROFIA DA EPIDERMIS

TABELA 07 Valores obtidos no estudo da espessura da epiderme (ESPEPID) ,na porção supra-papilar (nível 1) e no cone epitelial (nível 2), em micrômetros, entre doentes e controles.

ESPEPID	DOENTES			CONTROLES			t	GL	P
	M	DP	N	M	DP	N			
1	44,06	7,27	41	40,36	10,63	16	1,51	55	0,1<p<0,2
2	89,62	18,17	41	77,82	19,75	16	2,14	55	p<0,05

A tabela 07, permite analisar comparativamente a espessura de epiderme na porção supra-papilar (nível 1) e no cone epitelial (nível 2) entre os doentes e controles.

Utilizando-se o teste t de Student observa-se que, estatisticamente, não há diferença da espessura da epiderme na porção supra-papilar e existe diferença significativa para mais no nível 2, o que demonstra que a epiderme não é atrófica e os cones epiteliais são alongados comparativamente aos controles.

4.2.2 EXTENSAO DA RETIFICAÇÃO DA EPIDERMIS

TABELA 08 Resultados obtidos na medida da retificação da epiderme, em micrômetros, segundo a sua extensão entre doentes e controles.

RETIFICAÇÃO	DOENTES			CONTROLES			t	GL	P
	M	DP	N	M	DP	N			
	1,31	0,6	41	1,37	0,6	16	-0,29	55	0,7<p<0,8

Segundo a tabela 08, pode-se avaliar a extensão da retificação da epiderme entre doentes e controles. Observa-se que não há diferença significativa entre os grupos, utilizando-se o teste t de Student.

4.2.3 DISTURBIO DE PIGMENTAÇÃO MELANICA

Distúrbio de pigmentação esteve presente em 26 doentes (54,16%) e em nenhum controle (tabs. 03 e 04).

4.2.4 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS

O estudo histopatológico das lâminas demonstrou nítida proliferação de fibras colágenas a nível da transição dermo-hipodérmica, com extensão e envolvimento do subcutâneo. O derma papilar não apresentou alterações convincentes em relação às fibras colágenas, comparativamente com os controles.

A aparência do colágeno proliferado variou de fibras finas, coradas delicadamente em H&E, por vezes mais ricas em fibroblastos, até fibras colágenas aparentemente mais espessas, densamente compactas e fortemente eosinófilas, configurando padrão homogêneo ou hialinizado das fibras, com poucos fibroblastos, sendo que este último padrão foi o mais freqüentemente encontrado (figs: 12 e 13).

A disposição predominante dessas fibras de colágeno proliferadas era de forma paralela em relação à superfície epidérmica.



Fig. 12 Proliferação colágena. Predomínio de fibras finas e delicadas no subcutâneo, com freqüentes fibroblastos (seta). Doente nº 35 (H&E, 83 X).

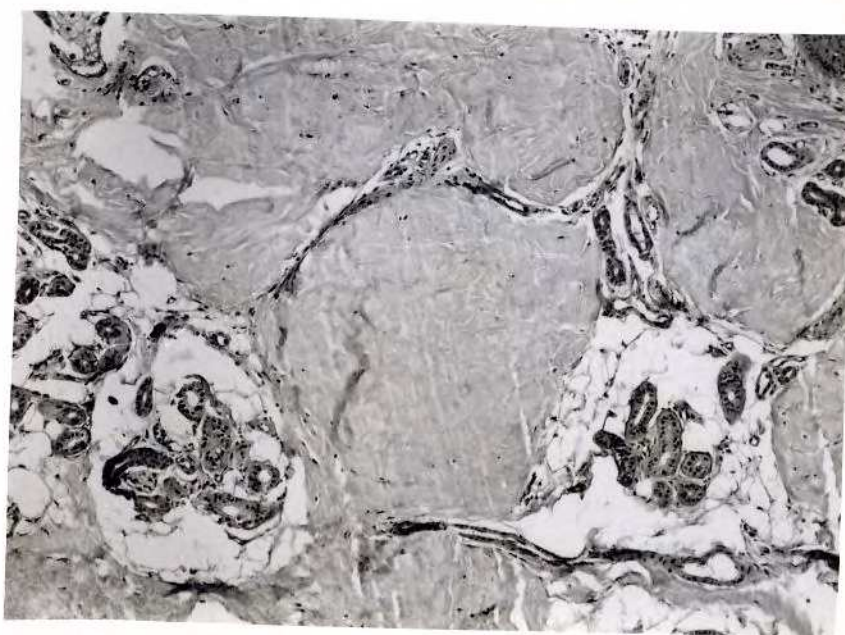


Fig. 13 Proliferação colágena densamente compactada, pouco celular. Doente nº 38 (H&E, 83X).

4.2.4.1 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS - MÉTODO QUANTITATIVO

TABELA 09 Valores observados quanto à proliferação de fibras colágenas (método quantitativo), através da contagem de pontos nos diferentes terços do gradeado, entre doentes e controles.

PFC TERÇO	DOENTES			CONTROLES			t	GL	P
	M	DP	N	M	DP	N			
SUP	105,35	8,97	48	100,37	16,53	16	1,52	62	0,1<p<0,2
MED	62,31	24,57	48	41,18	22,22	16	3,04	62	p<0,02
INF	42,18	22,36	38	12,62	8,13	16	5,12	52	p<0,001
TOT	209,39	44,98	38	154,18	37,52	16	4,31	52	p<0,001

A tabela 09, demonstra os valores obtidos na contagem dos pontos correspondentes às fibras colágenas (PFC) entre doentes e controles nos diferentes terços: superior (SUP); médio (MED); inferior (INF) e em toda a espessura (TOT). Esses dados avaliados pelo test t de Student permitem concluir que existe diferença significativa nos terços médio e inferior, sendo que a diferença é ainda maior a nível do terço inferior, bem como quando se compara toda a espessura.

IV. 2.4.2. PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS-METODO QUALITATIVO

TABELA 10 Distribuição da freqüência dos graus atribuídos quanto à proliferação de fibras colágenas (método quantitativo), nas leituras 1 e 2, em relação aos doentes.

VALORES (graus)	LEITURA 1 freqüência (%)		LEITURA 2 freqüência (%)	
0	3	6,25	4	8,33
I	21	43,75	21	43,75
II	16	33,33	15	31,25
III	8	16,67	8	16,67
TOTAL	48	100	48	100

$$\chi^2 = 0,17; \text{ GL} = 3 \quad p > 0.90$$

A tabela acima permite analisar comparativamente a freqüência dos graus atribuídos quanto à proliferação de fibras colágenas nas leituras 1 e 2, em relação aos doentes. Observa-se que não há diferença significativa entre elas.

Obs.: Foi escolhida a leitura 1 para a análise estatística, toda vez que se comparava a proliferação de fibras colágenas (método qualitativo) com os principais achados histopatológicos ou com os parâmetros clínicos.

TABELA 11 Distribuição da freqüência dos graus atribuídos quanto à proliferação de fibras colágenas (método quantitativo), nas leituras 1 e 2, em relação aos controles.

VALORES (graus)	LEITURA 1 freqüência (%)		LEITURA 2 freqüência (%)	
0	13	81,25	14	87,5
I	3	18,75	2	12,5
II	0	0	0	0
III	0	0	0	0
TOTAL	16	100	16	100

$p = 0,65$ (teste exato de Fisher)

A tabela acima permite analisar comparativamente a freqüência dos graus atribuídos nas leituras: 1 e 2, em relação aos controles. O estudo estatístico (teste exato de Fisher), demonstra que não há diferença significativa entre as leituras.

TABELA 12 Valores obtidos no estudo da proliferação de fibras colágenas em observações pareadas entre as leituras 1 e 2, em relação aos doentes e aos controles.

GRUPO	PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS (leituras 1 e 2)					
	M	DP	N	t	GL	P
DOENTES	0,04	0,45	48	0,62	47	0,5<p<0,6
CONTROLES	0,06	0,25	16	1,00	15	0,3<p<0,4

A tabela acima, pelo estudo estatístico (teste t de Student) em observações pareadas das leituras: 1 e 2, comprova-se que não há diferença significativa entre elas, tanto nos doentes como nos controles.

O índice de reprodutibilidade intra-observador entre as leituras 1 e 2, em relação aos doentes e aos controles em observações pareadas, foi de 82,9% e, a diferença máxima dos valores atribuídos "em graus" nessas observações pareadas nunca foi maior que um grau histológico.

4.2.5 ATROFIA DE ANEXOS

TABELA 13 Valores observados no estudo do diâmetro das glândulas sudoríparas (porções: secretora e ductal) em micrômetros, entre doentes e controles.

GL.SUDORIP.	DOENTES			CONTROLES			t	GL	P
	M	DP	N	M	DP	N			
SECRETORA	41,80	4,62	41	42,32	4,35	14	-0,37	53	0,7<p<0,8
DUCTAL	27,73	3,31	39	28,48	3,33	16	-0,75	53	0,4<p<0,5

O estudo do diâmetro das glândulas sudoríparas, tanto na porção secretora como na porção ductal, não apresentou diferença estatisticamente significativa (através do método t de Student) entre os doentes e os controles, como pode ser observado na tabela acima.

4.2.6 ALTERAÇÃO DE VASOS

Lesão vascular esteve presente em 25 casos (67%) dentre 37 doentes, excluídos 11 casos onde os fragmentos não apresentavam vasos adequados para a análise pelos critérios pré-estabelecidos (tab. 05). Observamos um total de 31 vasos comprometidos, sendo que 4 doentes apresentaram mais de um vaso com lesão por fragmento. Dentre os 31 vasos lesados, 14 eram arteríolas e 17 eram pequenas e médias artérias (tab. 14).

As artérias lesadas variaram de 103 a 480 μm com média de (248 μm) e as arteríolas variaram de 52 a 96 μm , com média de (70,64 μm). O tipo de lesão mais notável e consistente foi o espessamento da íntima (96,8%) (tab. 14). Esse tecido intimal apresentou padrões que variaram de um tecido conjuntivo fibroso frouxo edematoso, até fibroso denso, contendo ora células esparsas ou agrupadas com características de células musculares lisas (interpretadas como miointimais) ora fusiformes, sugerindo fibroblastos ou células mesenquimais (figs. 14 a 18).

Encontrou-se um vaso com dupla camada média muscular lisa, desprovido de limitante elástica interna, (interpretado como segmento de anastomose artério-venosa), com lesão intimal intensa.

O estreitamento da luz vascular variou em graus: leve (57%), moderado (30%) e intenso (13%), (tab. 14).

Não foram observados trombose, necrose fibrinóide, nem acúmulo de material mucóide na íntima.

Os casos controles não apresentaram lesão da íntima.

Alteração da lâmina elástica interna foi encontrada em

apenas cinco vasos (16,1%) (tab. 14) e caracterizou-se por replicação da membrana elástica (Figs. 15 e 16), por vezes com pequenas áreas de descontinuidade.

A camada média praticamente não apresentou alterações, apenas áreas focais de atrofia da média foram vistas em duas artérias com fibrose intensa da íntima. Também, não foi detectada fibrose cicatricial, ou qualquer evidência de inflamação antiga nesta camada.

Colageinização da camada média foi um achado freqüente nas artérias e não nas arteríolas, tanto nos doentes como nos controles. Esta observação era mais evidente nas artérias de maior diâmetro e naquelas de idade mais avançada, tanto para os doentes, como para os controles.

Fibrose da adventícia e telangiectasia dos "vasa vasorum" só foram observadas em duas artérias de maior diâmetro intensamente comprometidas.

Um caso mostrou vasculite linfocitária, caracterizada pela infiltração transmural do vaso por células inflamatórias mononucleares, predominantemente linfocitárias (Fig. 19).

TABELA 14 Valores observados quanto ao número e tamanho dos vasos comprometidos, tipo de lesão e grau de estreitamento da luz.

n(D)	vasos	tamanho(μ m)	Tipo de Lesão	grau(estr.luz)
1	1	144	FI	1+
2	1	192	FI+REI	3+
4	1	108	FI	1+
5	1	64	FI	1+
7	1	216	FI	2+
8	1	132	FI	1+
9	1	288	FI+REI	2+
10	1	64	FI	1+
11	1	55	FI	1+
18	1	125	FI+REI	2+
19	1	460	FI	2+
20	1	134	FI	3+
	2	480	FI	1+
22	1	182	FI	1+
24	1	103	FI	1+
25	1	55	FI	1+
26	1	52	FI	1+
	2	122	FI	1+
27	1	84	FI	2+
29	1	84	FI	2+
	2	144	FI	2+
	3	432	FI+REI+FA+TVV	2+
	4	480	FI+REI+FA+TVV	2+
30	1	91	FI	1+
32	1	480	FI	1+
36	1	60	FI	3+
	2	70	FI	3+
37	1	86	FI	1+
38	1	68	VL	-
42	1	60	FI	3+
47	1	96	FI	1+

Legenda - Graus: leve (1+), moderado (2+), intenso (3+); FI= fibrose da íntima; REI= replicação da lâmina elástica interna; FA=fibrose da adventícia; n(D)= número do doente; TVV= telangiectasia dos "vasa vasorum" e VL= vasculite linfocitária.



Fig. 14 Arteriola 60 μ m. Espessamento intimal com intensa redução da luz vascular. Doente nº 42 (W.V.G., 330X).

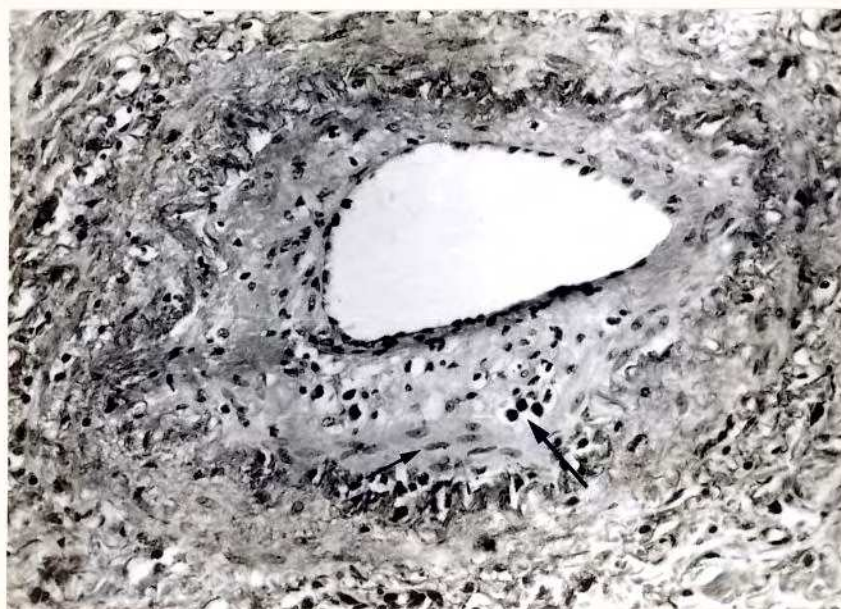


Fig. 15 Artéria 480 μ m. Espessamento intimal fibroso. Presença de células musculares lisas (seta curta) e fusiformes (seta longa). Replicação e descontinuidade da lâmina elástica interna. Doente nº 29 (W.V.G., 211X).

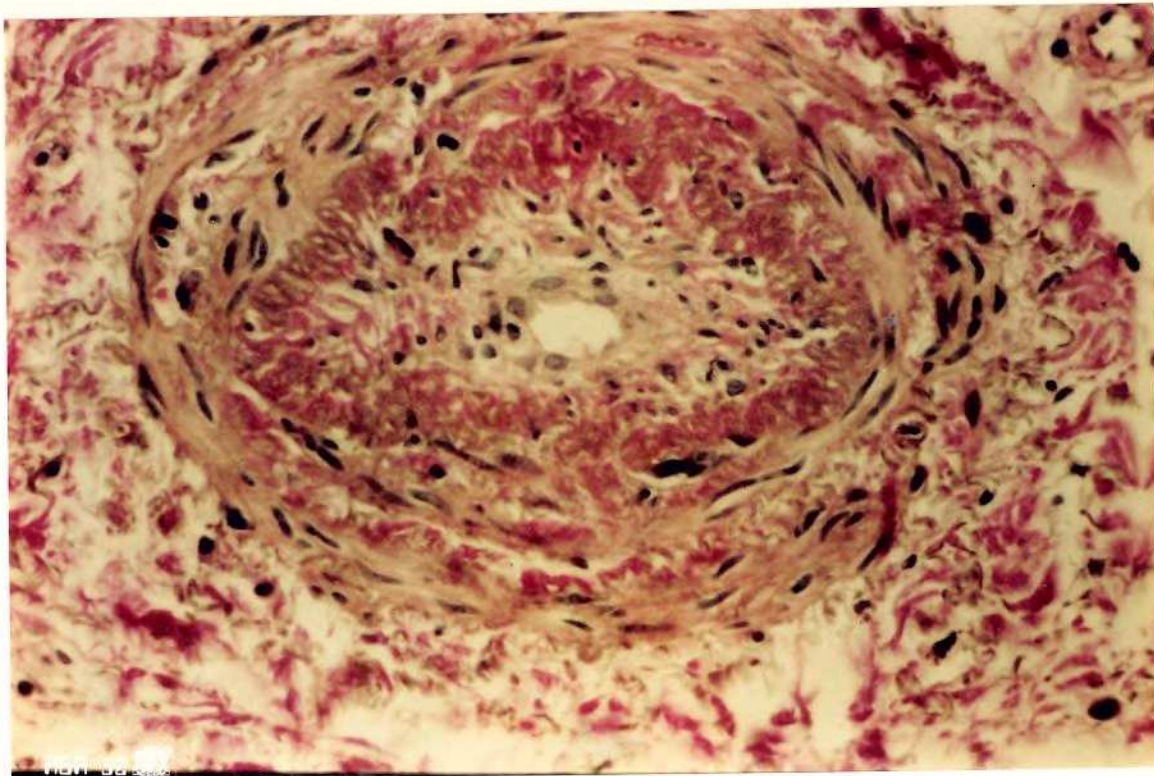


Fig. 16 Artéria 192 μ m. Espessamento intimal fibroso com intensa redução da luz arterial. Replicação da lâmina elástica interna. Doente nº 2 (W.V.G., 460X).

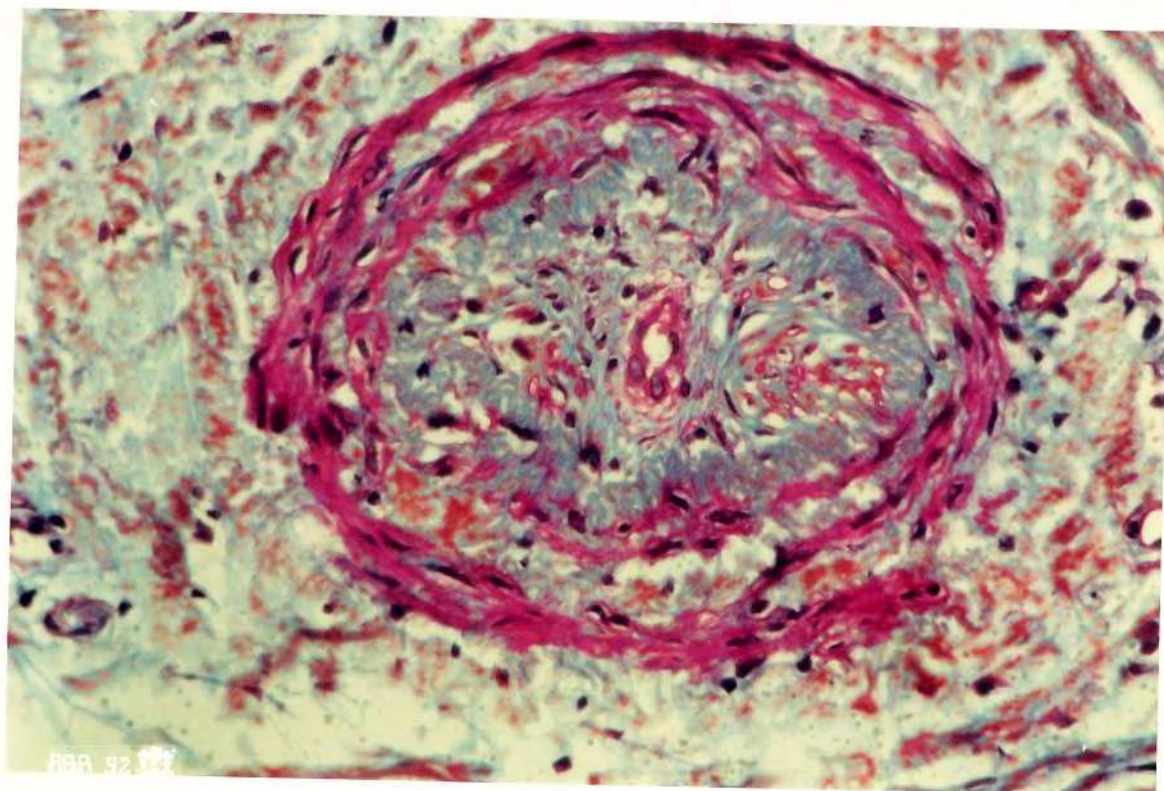


Fig. 17 Artéria acima. Agrupamento de células musculares lisas na íntima espessada. Doente nº 2 (Tricrômio de Masson, 460X).



Fig. 18 Artéria (144 μ m). Espessamento edematoso da íntima. Doente nº 29 (Tricrômio de Masson, 270X).

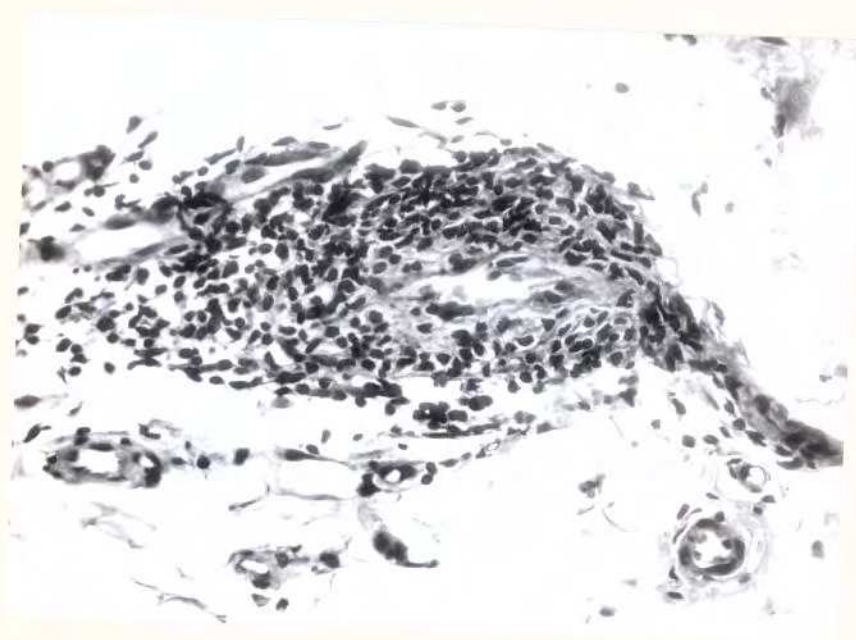


Fig. 19 Vaso sanguíneo (68 μ m). Infiltrado inflamatório linfocitário transmural. Doente nº 38 (H&E, 330X).

4.2.7 INFILTRADO INFLAMATORIO

Infiltrado inflamatório esteve presente somente em nove fragmentos de biópsia dentre os doentes, ou seja, 18,75% dos casos, e em nenhum dos controles (tabs. 03 e 04).

O infiltrado observado era leve e focal, de padrão inespecífico, composto por células mononucleadas, com predomínio de linfócitos. A distribuição era principalmente peri-vascular e de localização dérmica, nas porções média e profunda (Fig. 20).

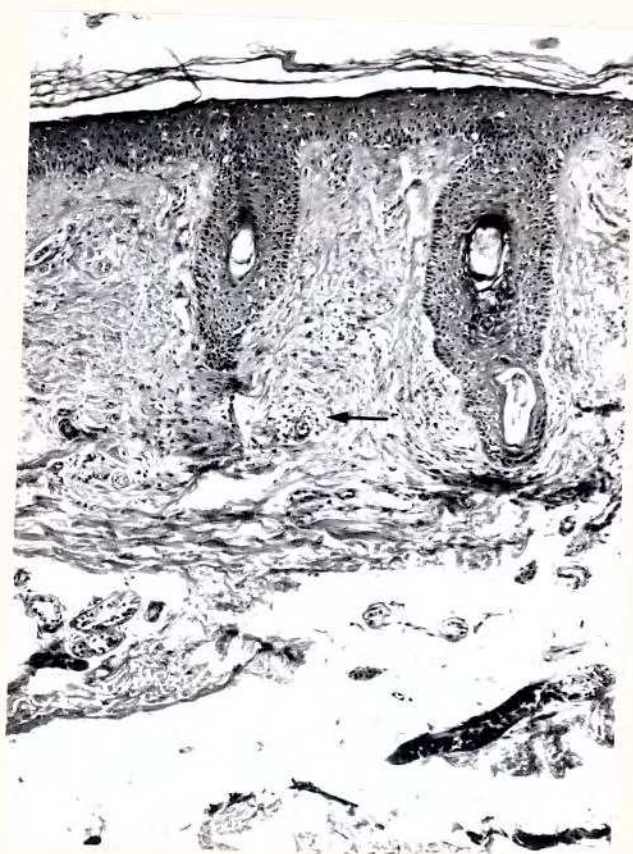


Fig. 20 Infiltrado inflamatório mononuclear leve peri-vascular dérmico (seta). Doente nº 9 (H&E, 83X).

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS PRINCIPAIS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS ENTRE SI E EM RELAÇÃO A PARÂMETROS CLÍNICOS

4.3.1.1 ESPESSURA DA EPIDERME E PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS.

O estudo estatístico (método de correlação simples) demonstrou que não existe diferença significativa entre a espessura da epiderme (nível 2) e a quantidade de fibras colágenas em toda a espessura, tanto entre os controles como entre os doentes. Ver abaixo:

controles : $r = 0,47$; $GL = 12$; $p > 0,05$.

doentes : $r = 0,06$; $GL = 32$; $p > 0,05$.

4.3.1.2 ESPESSURA DA EPIDERME E IDADE

Pode-se observar pelo estudo estatístico (método de correlação simples) que existe uma correlação negativa entre a espessura da epiderme (nível 2) e a idade (em anos) em relação aos controles, ou seja, com o aumento da idade há diminuição da espessura da epiderme a nível do cone epitelial, porém não houve diferença significativa em relação aos doentes, como se segue:

controles : $r = -0,65$; $GL = 12$; $p < 0,05$.

doentes : $r = -0,15$; $GL = 39$; $p > 0,05$.

4.3.1.3 ESPESSURA DA EPIDERMIS E PESO

O estudo estatístico (através do método de correlação simples) demonstrou que existe diferença significativa entre as variáveis: espessura da epiderme no nível 2 e peso nos controles, porém não houve correspondência em relação aos doentes, como se segue:

controles : $r = 0,57$; $GL = 12$; $p < 0,05$.

doentes : $r = -0,28$; $GL = 33$; $p > 0,05$.

4.3.1.4 ESPESSURA DA EPIDERMIS E TEMPO DE DOENÇA

O estudo estatístico (método de correlação simples) demonstrou que existe correlação negativa entre a espessura da epiderme (nível 2) e o tempo de doença (anos), ou seja, ocorre uma diminuição da espessura do cone epitelial com o aumento do tempo de doença, como se segue:

$r = -0,36$; $GL = 39$; $p < 0,05$.

4.3.2.1 DISTÚRPIO DE PIGMENTAÇÃO MELÂNICA E PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS.

TABELA 15 Valores obtidos no estudo da presença de distúrbio de pigmentação em relação à proliferação de fibras colágenas (em graus).

DISTÚRPIO DE PIGMENTAÇÃO	PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS									
	0		I		II		III		TOTAL	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
PRESENTE	0	0	14	51,85	8	29,62	5	18,51	27	100
AUSENTE	3	14,28	7	33,33	8	38,09	3	14,28	21	100
TOTAL	3		21		16		8		48	

$$\chi^2 = 5,16 ; GL = 3 ; 0,10 < P < 0,20.$$

Verifica-se pelo estudo estatístico (método do χ^2) que não existe correlação entre o distúrbio de pigmentação e a proliferação de fibras colágenas.

4.3.2.2 DISTURBIO DE PIGMENTAÇÃO MELANICA E FORMA CLINICA

TABELA 16 Valores observados no estudo da presença de distúrbio de pigmentação melânica em relação à forma clínica.

DISTURBIO DE PIGMENTAÇÃO	INFLAMATORIA		NAO INFLAMATORIA		TOTAL
	N	(%)	N	(%)	
PRESENTE	14	51,85	12	57,15	26
AUSENTE	13	48,15	9	42,85	22
TOTAL	27	100	21	100	48

χ^2 cor = 0,005 ; GL = 1 ; p > 0,9.

Na tabela acima pode-se observar, pelo estudo estatístico (teste do χ^2 com fator de correção), que não há diferença significativa entre distúrbio de pigmentação e forma clínica da ES.

4.3.2.3 DISTÚRPIO DE PIGMENTAÇÃO MELÂNICA E ESTADIAMENTO CLÍNICO

TABELA 17 Valores observados no estudo da presença de distúrbio de pigmentação em função do estadiamento clínico (em graus).

DISTÚRPIO DE		ESTADIAMENTO CLÍNICO							
PIGMENTAÇÃO	1 n (%)		2 n (%)		3 n (%)		4 n (%)		TOTAL n (%)
PRESENTE	2	10	3	15	5	25	10	50	20 100
AUSENTE	2	15,38	1	7,7	2	15,38	8	61,54	13 100
TOTAL	4		4		7		18		33

$$\chi^2 = 1,07 ; GL = 3 ; 0,70 < p < 0,80.$$

A análise estatística (método do χ^2) demonstra que não há diferença significativa entre as variáveis.

4.3.3.1 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS METODO QUANTITATIVO E METODO QUALITATIVO

TABELA 18 Análise da variância aplicada aos valores observados na avaliação da proliferação de fibras colágenas, métodos quantitativo (através da contagem de pontos correspondentes à fibras colágenas em toda a espessura) e qualitativo (em graus, leitura 1), em relação aos doentes.

PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS					
METODO QUALITATIVO (graus)	METODO QUANTITATIVO M			N	
I	178,77			18	
II	226,23			13	
III	261,28			7	
GRANDE MÉDIA	210,21			38	
FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	F	P
ENTRE	39381,46	2	19690,73	20,42	p<0.001
DENTRO	33746,84	35	964,19		
TOTAL	73128,30	37			

De acordo com o teste de TUKEY existe diferença significativa entre as três médias, onde $Q = 5,94$ e $Q = 3,41$ para as comparações I X II e II X III respectivamente e $p < 0,01$, em ambos os casos. Não foi possível a análise comparativa com o grau "zero", por apresentar apenas um único caso com essa graduação e contagem de pontos correspondentes a fibras colágenas em toda a espessura.

TABELA 19 Valores observados na análise da proliferação de fibras colágenas, métodos: quantitativo, através da contagem de pontos correspondentes à fibras colágenas em toda a espessura (PFC-tot) e qualitativo, em graus (leitura 1), em relação aos controles.

PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS

M.QUANTITATIVO

M. QUALITATIVO

PFC	GRAU 0			GRAU I			t	GL	P
	M	DP	N	M	DP	N			
(tot)	149,23	40,05	13	175,66	9,07	3	-1,10	14	0,2<p<0,3

Utilizando-se o método estatístico t de Student, observa-se que não há diferença significativa entre as variáveis.

4.3.3.2 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS E ATROFIA DE ANEXOS

TABELA 20 Resultados obtidos no estudo do diâmetro das glândulas sudoríparas (porção secretora) em função da proliferação de fibras colágenas em graus (leitura 1), nos doentes.

PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS		DIAMETRO SUDORÍPARO PORÇÃO SECRETORA (μ m)			
(GRAUS)		M		N	
0		39,66		2	
I		42,32		18	
II		42,41		15	
III		39,41		6	
GRANDE MÉDIA		41,80		41	
FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	F	P
ENTRE	53,74	3	17,91	0,82	p>0,05
DENTRO	803,20	37	21,70		
TOTAL	856,94	40			

A tabela acima, pelo estudo estatístico (análise da variância) demonstra que não há uma correlação significativa entre o diâmetro das glândulas sudoríparas (porção secretora) e a proliferação de fibras colágenas (em graus).

TABELA 21 Valores observados no estudo do diâmetro das glândulas sudoríparas (porção ductal) em função da proliferação de fibras colágenas em graus (leitura 1), nos doentes.

PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS (GRAUS)	DIÂMETRO SUDORIPARO PORÇÃO DUCTAL (µm)				
	M			N	
O	28,76			3	
I	28,35			18	
II	27,29			12	
III	26,24			6	
GRANDE MÉDIA	27,73			39	
FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	F	P
ENTRE	25,73	3	8,57	0,76	p>0,05
DENTRO	393,04	35	11,23		
TOTAL	418,77	38			

A tabela acima, pelo estudo estatístico (análise da variância), demonstra que a correlação entre a proliferação de fibras colágenas (em graus) e o diâmetro da porção ductal das glândulas sudoríparas não é significativa.



Fig. 21 Anexos sudoríparos envoltos por tecido adiposo abundante, proliferação colágena leve (grau I). 1-porção secretora: 60,1 μm ; 2-porção ductal: 28,84 μm . Doente n $^{\circ}$ 22 (PAS, 133X).

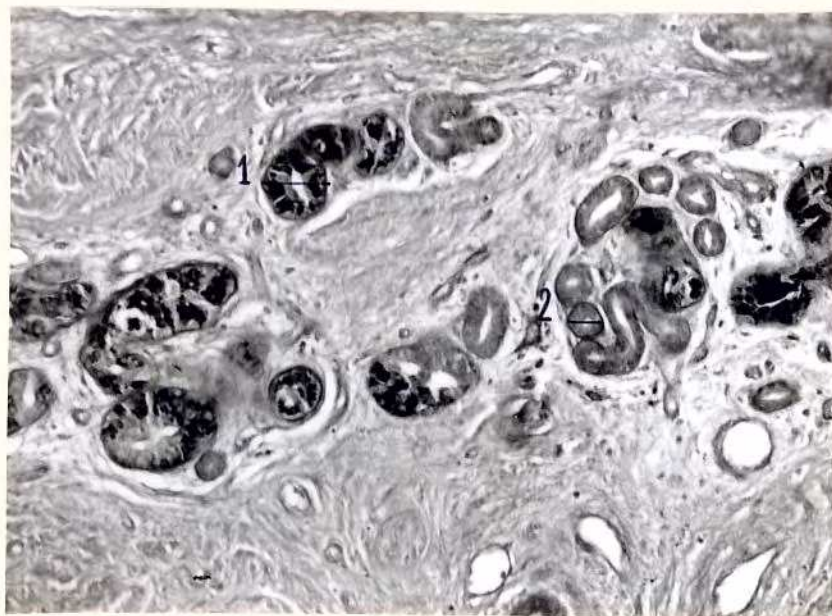


Fig.22 Anexos sudoríparos envoltos por intensa fibrose (grau III) 1- porção secretora: 57,69 μm ; 2- porção ductal: 28,84 μm . Doente n $^{\circ}$ 29 (PAS, 133X).

4.3.3.3.1 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS (MÉTODO QUANTITATIVO) E ALTERAÇÃO DE VASOS

O estudo estatístico (teste de correlação simples), mostrou que não há correlação significativa entre a quantidade de fibras colágenas (através da contagem de pontos correspondentes à fibras colágenas em toda a espessura) e alteração de vasos, onde: $r = 0,39$; $GL = 23$; $p > 0,05$.

4.3.3.3.2 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS (MÉTODO QUALITATIVO) E ALTERAÇÃO DE VASOS

TABELA 22 Valores obtidos no estudo da proliferação de fibras colágenas em graus (leitura 1) e lesão vascular.

PROLIFERAÇÃO FIBRAS		LESÃO VASCULAR				
COLAGENAS (graus)		AUSENTE		PRESENTE		TOTAL
		N	(%)	N	(%)	
0		1	8,33	1	4	2
I		5	41,67	8	32	13
II		5	41,67	9	36	14
III		1	8,33	7	28	8
TOTAL		12	100	25	100	37

$\chi^2 = 2,01$; $GL = 3$; $0,50 < p < 0,60$.

A análise estatística (teste do χ^2) demonstra que a correlação entre a proliferação de fibras colágenas e lesão vascular não é significativa.

4.3.3.4 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS E IDADE

O estudo estatístico (correlação simples - teste monocaudal) demonstrou uma diferença significativa entre essas variáveis, caracterizada por uma correlação negativa, em relação aos controles. Com o aumento da idade (anos) verificou-se uma diminuição da quantidade de fibras colágenas. Não houve correspondência entre os doentes, como se segue:

controles : $r = -0,50$; $GL = 14$; $p < 0,05$.

doentes : $r = 0,22$; $GL = 36$; $p > 0,05$.

4.3.3.5 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS E PESO

Pelo estudo estatístico (método de correlação simples), pode-se constatar que existe uma correlação positiva entre a quantidade de fibras colágenas e o peso, em relação aos controles. Não houve correspondência em relação aos doentes, como se segue:

controles : $r = 0,65$; $GL = 12$; $p < 0,05$.

doentes : $r = -0,31$; $GL = 23$; $p > 0,05$.

4.3.3.6 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS E TEMPO DE DOENÇA

Pelo estudo estatístico (método de correlação simples), pode-se observar que não houve diferença significativa entre a quantidade de fibras colágenas e o tempo de doença (em anos), onde: $r = 0,12$; $GL = 23$; $p > 0,05$.

4.3.3.7.1 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS (MÉTODO QUANTITATIVO) E FORMA CLÍNICA

O estudo estatístico (método de correlação simples) demonstra que não há diferença significativa entre a quantidade de fibras colágenas (através da contagem de pontos correspondentes à fibras colágenas em toda a espessura) e a forma clínica, como se pode observar:

$r = -0,17$; $GL = 23$; $p > 0,05$.

4.3.3.7.2 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS (MÉTODO QUALITATIVO) E FORMA CLÍNICA.

TABELA 23 Valores observados no estudo da proliferação de fibras colágenas em graus (leitura 1) e a forma clínica.

PROLIF.COLAGENA	INFLAMATORIA		NÃO INFLAMATORIA		TOTAL
(graus)	N	(%)	N	(%)	
0	0	0	3	14,29	3
I	14	51,85	7	33,33	21
II	8	29,63	8	38,09	16
III	5	18,52	3	14,29	8
TOTAL	27	100	21	100	48

$\chi^2 = 5,16$; $GL = 3$; $0,10 < p < 0,20$

Observa-se pelo estudo estatístico (teste do χ^2), que não há correlação significativa entre proliferação de fibras colágenas e forma clínica.

4.3.3.8.1 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS (MÉTODO QUANTITATIVO) E ESTADIAMENTO CLÍNICO

Observa-se pelo estudo estatístico (método de correlação simples) que não há diferença significativa em relação à quantidade de fibras colágenas e o estadiamento clínico, onde: $r = 0,04$; $GL = 23$; $p > 0,05$.

4.3.3.8.2 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS (MÉTODO QUALITATIVO) E ESTADIAMENTO CLÍNICO

TABELA 24 Valores observados em relação à proliferação de fibras colágenas em graus (leitura 1) e o estadiamento clínico (em graus).

PROLIF. COLAGENA			ESTADIAMENTO CLINICO							
(GRAUS)	1		2		3		4		TOTAL	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)		
0	0	0	1	25	0	0	0	0	1	
I	2	50	2	50	4	57,14	8	44,44	16	
II	2	50	0	0	3	42,86	5	27,78	10	
III	0	0	1	25	0	0	5	27,78	6	
TOTAL	4	100	4	100	7	100	18	100	33	

$\chi^2 = 12,56$; $GL = 9$; $0,10 < p < 0,20$.

O estudo estatístico (teste do χ^2) demonstra que não há correlação significativa entre a proliferação de fibras colágenas e o estadiamento clínico.

4.3.4.1 ALTERAÇÃO DE VASOS E IDADE

TABELA 25 Resultados obtidos no estudo da presença de lesão vascular em função da idade (em anos) nos doentes e controles.

GRUPOS	IDADE				
	M		N		
CONTROLES	45,68		16		
DOENTES SEM LESAO VASCULAR	48,00		12		
DOENTES COM LESAO VASCULAR	49,48		25		
GRANDE MÉDIA	48,00		53		
FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	F	P
ENTRE	140,32	2	70,16	0,39	0,6<p<0,7
DENTRO	8939,68	50	178,79		
TOTAL	9080,00	52			

Como se pode observar na tabela acima, através do estudo estatístico (análise da variância), não há diferença significativa entre as variáveis, há apenas uma tendência da lesão vascular ocorrer numa média maior de idade.

4.3.4.2 ALTERAÇÃO DE VASOS E TEMPO DE DOENÇA

TABELA 26 Resultados obtidos no estudo da presença de lesão vascular em função do tempo de doença (em anos).

TEMPO DE DOENÇA	DOENTES SEM			DOENTES COM					
	LESÃO VASCULAR			LESÃO VASCULAR					
	M	DP	n	M	DP	n	t	GL	p
	8,94	7,10	12	8,20	7,27	25	0,29	35	0,7 < p < 0,8

Observa-se na tabela acima, utilizando-se do test t de Student, que não existe diferença significativa entre os grupos de doentes com e sem lesão vascular e o tempo de doença.

4.3.4.3 ALTERAÇÃO DE VASOS E FORMA CLINICA

TABELA 27 Valores obtidos no estudo da correlação entre lesão vascular e forma clínica.

LESÃO VASCULAR	INFLAMATORIA		NÃO INFLAMATORIA		TOTAL
	n	(%)	n	(%)	
PRESENTE	16	80	9	52,95	25
AUSENTE	4	20	8	47,05	12
TOTAL	20	100	17	100	37

$$\chi^2 = 1,96; GL=1; 0,10 < p < 0,20$$

Na tabela acima, pode-se verificar pelo estudo estatístico (teste do χ^2), que não há diferença significativa entre as variáveis, porém observa-se uma tendência à presença de lesão vascular ser maior na forma clínica inflamatória.

4.3.4.4 ALTERAÇÃO DE VASOS E ESTADIAMENTO CLINICO

TABELA 28 Valores obtidos no estudo da correlação entre a presença de lesão vascular e estadiamento clínico.

LESÃO VASCULAR	ESTADIAMENTO CLINICO								TOTAL N (%)
	1 N	1 (%)	2 N	2 (%)	3 N	3 (%)	4 N	4 (%)	
PRESENTE	1	4	3	12	12	48	9	36	25 100
AUSENTE	2	16,67	1	8,33	4	33,33	5	41,67	12 100
TOTAL	3		4		16		14		37

$$\chi^2 = 2,92; GL = 4; 0,50 < p < 0,60.$$

O estudo estatístico (método do χ^2) demonstra que não há correlação significativa entre essas variáveis.

5 DISCUSSAO

5.1 ATROFIA E RETIFICAÇÃO DA EPIDERMIS

Tradicionalmente tem sido postulado que uma das alterações histopatológicas da pele na ES, em relação ao componente epitelial, consiste fundamentalmente da atrofia da epiderme e seus anexos, com achatamento dos cones epiteliais (O'LEARY, 1957; FISHER & RODNAN, 1960; FLEISCHMAJER, 1977; RODNAN, 1979).

Os livros textos de PINKUS & MEHREGAN (1976) e ROOK et alii (1979), sugerem que inicialmente a epiderme pode se apresentar histologicamente com espessura preservada e que nos estágios tardios, ocorreriam atrofia e perda dos cones epiteliais.

Todas essas afirmações quanto ao padrão histopatológico da epiderme têm sido firmadas e propagadas com base em avaliações subjetivas.

O trabalho pioneiro de MORLEY et alii (1985), demonstrou, através de mensurações quantitativas, que a epiderme na ES apresenta espessura preservada e cones epiteliais proeminentes, comparativamente aos controles.

FLEISCHMAJER et alii (1976), demonstraram epiderme e anexos preservados, e incorporação aumentada de 3 H-timidina pelas células epidérmicas em pele clinicamente comprometida por essa doença. O índice aumentado desse aminoácido marcado com radioisótopo, defende a hipótese de que a epiderme não é

atrófica.

Os resultados quantitativos obtidos no presente estudo também apóiam a hipótese de que a epiderme não é atrófica nesta doença. A epiderme apresentou-se acantótica com padrão regular, e cones epiteliais proeminentes, comparativamente aos controles, como observados por MORLEY et alii (1985).

Em relação à retificação da epiderme pode-se comprovar que não existe diferença estatisticamente significativa entre os doentes e controles. Esses achados falam contra o tradicionalmente descrito em relação à epiderme na ES, ou seja, padrão atrófico com achatamento ou até mesmo perda de cones epiteliais (O'LEARY, 1957 ; FISHER & RODNAN, 1960, FLEISCHMAJER, 1977; RODNAN, 1979).

Interroga-se, se essa afirmação apresentada por esses autores não estaria vinculada à própria topografia da pele examinada, como o dorso de antebraço utilizado por FISHER & RODNAN, 1960. Segundo MARKS (1981), a epiderme varia de padrão e espessura de acordo com as diferentes regiões da pele. Acredita-se que mais estudos quantitativos, de topografias cutâneas distintas, na análise da espessura e retificação da epiderme comparativamente a controles, seriam esclarecedores.

5.2 DISTURBIO DE PIGMENTAÇÃO MELÂNICA

Clinicamente é clássica a alteração da pigmentação cutânea de padrão leucomelanodérmico em pacientes com ES, também conhecida como lesão em "sal e pimenta" (MEDSGER, JR., 1989).

Segundo TUFFANELLI & WINKELMANN (1961), esta alteração está presente em aproximadamente um terço dos doentes e quando proeminente, é confundida com doença de Addison (O' LEARY et alii, 1957).

Embora freqüente na clínica, poucos são os trabalhos histopatológicos que demonstram a presença deste achado (FISCHER & RODNAMN, 1960 ; RODNAN 1979), bem como, breves menções sobre essas alterações da pigmentação têm sido encontradas na literatura (KLAUS, 1979).

A freqüência deste achado em estudos histopatológicos não tem sido descrita. Através deste trabalho pode-se demonstrar que o distúrbio de pigmentação, tanto para mais como para menos, esteve presente em 54,16% das biópsias dos doentes com ES e em nenhum controle.

Esse resultado reflete uma incidência considerável deste achado a nível de microscopia óptica, uma vez que as áreas escolhidas para a biópsia eram pré-estabelecidas e não dirigidas para zonas clinicamente com alteração da pigmentação. Pode-se dizer também que esse achado, embora não específico da ES, deve ser valorizado quando presente, bem como, poderá colaborar muito para o diagnóstico da doença, especialmente naqueles casos onde os demais achados histopatológicos são discretos.

A real origem e a patogênese deste fenômeno não está

totalmente esclarecida.

ORTONNE & PERROT (1980), através de estudo de microscopia eletrônica relatam o desaparecimento dos melanócitos nas áreas amelanóticas, e diminuição de melanossomos nas áreas hipopigmentadas com evidentes alterações degenerativas do citoplasma dos melanócitos, com transferência destes para os queratinócitos vizinhos. Esses autores especulam que a hipermelanose estaria relacionada ao aumento de atividade dos melanócitos epidérmicos e a hipomelanose e amelanose seriam atribuídos à destruição e ao desaparecimento dos melanócitos.

SANCHEZ et alii (1983), demonstraram através de estudos histoquímicos e de microscopia eletrônica, achados semelhantes aos do vitiligo nas áreas amelanóticas da ES e são concordantes com os achados acima descritos. Também demonstraram o encontro de numerosas células de Langerhans e sugerem a participação das mesmas na patogênese de destruição de melanócitos.

A ocorrência simultânea de hiper e hipomelanogênese no mesmo paciente fica difícil de explicar. ORTONNE & PERROT (1980) propõem as seguintes hipóteses: durante uma primeira fase ocorreria aumento da melanogênese por um estímulo desconhecido. Esse aumento da atividade resultaria no aumento de metabólitos citotóxicos intramelanocíticos, que por conseguinte levaria à destruição de melanócitos com formação de áreas hipopigmentadas e/ou amelanóticas.

Outras hipóteses têm sido aventadas, como o aumento da tirosina (substrato para a síntese de melanina) secundário a um bloqueio na sua degradação em pacientes com ES (NISHIMURA et alii

1958). Porém o aumento deste substrato nesta moléstia tem sido contestado por STACHOW (1975) apud ORTONNE & PERROT (1980).

SMITH et alii (1976) também não encontraram nenhuma diferença a nível plasmático do β -MSH (hormônio estimulante dos melanócitos) de doentes com ES, comparativamente aos controles.

5.3 PROLIFERAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS

A análise histopatológica neste trabalho demonstrou variações de padrão morfológico e tintorial das fibras colágenas: desde fibras finas, coradas mais delicadamente pelo H&E, geralmente com maior número de fibroblastos, até fibras mais eosinófilas, hialinizadas e densamente compactadas e com poucos fibroblastos.

Segundo LEVER & LEVER (1990) o primeiro padrão é visto nas fases iniciais da doença e seria equivalente a um colágeno jovem, recém sintetizado, e o segundo corresponderia a um estágio tardio ou de consolidação da doença, porém não é especificado qual seria o tempo necessário para se observar essas feições histopatológicas distintas.

No presente estudo, predominaram os achados de fibras colágenas hialinizadas, mais densamente agrupadas e com poucos elementos fibroblásticos. Isso poderia ser justificado devido ao longo tempo de doença na maioria dos pacientes, sendo que 79,2% dos doentes apresentavam tempo de doença maior que um ano e com média de 7,96 anos.

Em adição, o padrão das fibras colágenas encontrado poderia, em parte, ser explicado devido ao aumento na produção de glicosaminoglicanos e fibronectina na matriz extracelular (FLEISCHMAJER & PERLISH, 1972; FLEISCHMAJER et alii, 1980 a) com conseqüente alargamento do espaço interfibrilar e redução ou desaparecimento do espaço entre os feixes de colágeno, levando a uma pseudo-homogeneização do colágeno, responsável pela aparência hialinizada e compacta do tecido conjuntivo, quando

analisados à microscopia óptica comum.

Estudos atuais mostram que o acúmulo e a distribuição de fibroblastos durante o processo de fibrose e colageinização na ES estão na dependência da sua capacidade de proliferação e quimiotaxia induzida por muitas citocinas liberadas por elementos inflamatórios, plaquetas, células endoteliais e até mesmo pela própria matriz extracelular cutânea (CROMBRUGGHE et alii, 1990; MAUCH & KRIEG, 1990; POSTLETHWAITE, 1990).

Quanto ao nível de proliferação de fibras colágenas, o derma papilar não mostrou alterações distintas em relação aos controles, sendo que a proliferação dessas fibras foi nítida na interface dermo-hipodérmica com extensão ao subcutâneo e substituição variável do tecido adiposo. Esses achados foram concordantes com os trabalhos de FLEISCHMAJER et alii (1972) e de REED et alii (1973).

Essa afirmação também pode ser confirmada neste trabalho, através do estudo quantitativo, onde detectou-se diferença significativa na proliferação de fibras colágenas entre doentes e controles nos terços: médio e inferior do gradeado, sendo que neste último a diferença foi ainda maior, o que corresponde basicamente ao hipoderma.

Igualmente LE ROY (1974) e BUCKINGHAN et alii (1978), através de estudos de fibroblastos em cultura de pacientes com ES, comprovaram aumento consistente de produção de fibras colágenas, comparativamente com controles normais, além de que BUCKINGHAN et alii (1978) também constataram que os fibroblastos derivados das porções mais profundas da derme sintetizavam mais

colágeno do que aqueles derivados das porções mais elevadas.

FLEISCHMAJER et alii (1980 b, 1981) em estudos "in vitro", revelaram um aumento da síntese de colágeno e fibronectina pelos fibroblastos de pacientes com ES. A população mais ativa foi obtida dos níveis mais profundos da camada reticular da derme e subcutâneo, apoiando os achados do presente estudo.

Os trabalhos em microscopia eletrônica também têm demonstrado variações, principalmente no tamanho das fibras colágenas em função do nível das camadas da pele. Na derme superficial têm sido observadas fibras colágenas de tamanho regular e periodicidade habitual do colágeno maduro tipo I, sendo que nas porções mais profundas da derme e no subcutâneo têm sido observadas fibras colágenas de tamanho variável, com periodicidade mantida e freqüentes fibras finas, notadamente de padrão imaturo ou embrionário (HAYES & RODNAN, 1971 ; FLEISCHMAJER et alii, 1972). Segundo FISCHER & RODNAN (1960) nenhuma alteração foi notada a nível da derme papilar em relação ao colágeno.

Dentre os achados histopatológicos, o mais notável e consistente foi a proliferação de fibras colágenas dermo-hipodérmicas, acompanhado de substituição variável do tecido adiposo do hipoderma e em torno das glândulas sudoríparas nos pacientes com ES, comparativamente aos controles.

O grau de proliferação de fibras colágenas, dos doentes, foi variável e claramente demonstrado através das leituras 1 e 2 (tab. 10). A maior freqüência foi de grau I, com 21 casos (43,75%) ou seja, a proliferação de fibras colágenas foi

discreta ou mínima. Na seqüência de distribuição, tivemos o grau II, com 16 casos (33,33%) e apenas 8 casos de grau III (16,67%), com intensa proliferação de fibras colágenas e praticamente total substituição do tecido adiposo.

Também os achados de FLEISCHMAJER et alii (1972) foram semelhantes ao desse estudo. Embora se utilizando de casuística pequena e sem se valerem de um sistema de graduação propriamente dito, encontraram redução do tecido adiposo do hipoderma com substituição variável por tecido colágeno, sendo que apenas um dos dez casos mostrou substituição completa.

Em três casos (6,25%) dentre os doentes, foi atribuído grau "zero", ou seja não foi observada proliferação colágena perceptível através deste método qualitativo.

Na maioria dos casos controles foi atribuído o grau zero (81,25%) e o grau I esteve presente em três casos (18,75%), porém a nenhum caso controle foi atribuído grau II ou III.

Pode-se dizer que um mínimo de casos entre os doentes, histologicamente analisados pelo método qualitativo, são considerados "normais" (falsos negativos) e um pequeno número de casos controle foram considerados "doentes", com características de grau I (falsos positivos).

Este estudo demonstrou que não houve diferença significativa entre as duas leituras, na avaliação qualitativa da proliferação de fibras colágenas, além de ter tido um bom índice de reprodutibilidade intra-observador, que foi de 82,9%. A análise entre as duas leituras pareadas demonstrou que a diferença máxima

entre os graus atribuídos a cada lâmina nunca foi maior do que um grau histológico. Também, o estudo estatístico mostrou correspondência entre os dois métodos de avaliação da proliferação de fibras colágenas, o que justifica que ambos os métodos podem ser utilizados na avaliação da fibrose.

O presente trabalho demonstra claramente com evidências histológicas e com mensuração objetiva de que ocorre efetivamente aumento na quantidade de fibras colágenas totais nos doentes com ES. São poucos os estudos quantitativos na avaliação da proliferação colágena na ES.

RODNAN et alii (1979) se utilizaram do peso de biópsias de pele, como medida objetiva, para quantificar o colágeno cutâneo, e da análise bioquímica da água e hidroxiprolina (principal aminoácido da molécula proteica do colágeno) para avaliar o conteúdo de colágeno em 147 doentes com ES. Obtiveram como resultado marcado aumento, altamente significativo no peso e no conteúdo total de colágeno cutâneo nos doentes comparativamente com controles normais, associado com aumento proporcional do espessamento cutâneo.

Também outros autores se valeram de estudos bioquímicos para investigar o conteúdo de colágeno nesta doença, cujos resultados foram conflitantes. FLEISCHMAJER (1964) e FLEISCHMAJER & KROL (1967) não observaram nenhuma mudança no conteúdo de colágeno total na pele de pacientes esclerodérmicos. LAITINEN et alii (1969) consideraram um aumento no colágeno solúvel, sendo que, NELDNER et alii (1966), BLACK et alii (1970) averiguaram um decréscimo do colágeno total da pele comprometida na ES.

BLACK et alii (1970) e ARHO (1972) usaram uma técnica

radiográfica modificada para estimar a espessura da pele em pacientes com ES. O primeiro demonstrou, num grupo de 13 mulheres, decréscimo na espessura da pele e da densidade do colágeno, comparativamente com controles normais. Já ARHO (1972) não observou nenhuma diferença estatisticamente significativa na espessura da pele em sete pacientes com esclerodermia, sendo apenas dois deles da forma sistêmica.

PIERRARD (1989) mostrou, através de estudo morfométrico, que a derme de pacientes com ES era significativamente mais espessa que dos controles.

Os nossos resultados apóiam os demonstrados por RODNAN et alii (1979) e PIERARD (1989) em relação à quantidade total de colágeno na ES, através de um método objetivo direto simples, prático e preciso. Essa metodologia aplicada na ES é inédita, segundo extensa revisão da literatura até o momento e permite estudos retrospectivos através de cortes em parafina, recurso este impraticável pelas técnicas empregadas nos demais trabalhos anteriormente citados.

Por ser um método quantitativo é de grande valia para medir a intensidade do envolvimento cutâneo, como demonstrado, além de permitir uma mensuração sensível na avaliação de respostas as terapêuticas, bem como servir de parâmetro da própria evolução natural desta doença.

5.4 ATROFIA DE ANEXOS

Em relação aos anexos cutâneos, os trabalhos histopatológicos fazem apenas citações quanto à atrofia dos mesmos (O'LEARY et alii, 1957; FISHER & RODNAN, 1960; LEVER & LEVER 1990). Nenhum estudo quantitativo na avaliação da atrofia anexial cutânea tem sido descrito nesta doença.

O presente estudo, através da medida do diâmetro das glândulas sudoríparas, tanto da porção secretora, como ductal não demonstrou diferença estatisticamente significativa, comparativamente aos controles.

Já FLEISCHMAJER et alii (1972) relatam que dentre dez casos, seis apresentaram anexos sudoríparos preservados e quatro eram atróficos, baseados em análises subjetivas.

Acredita-se que outras avaliações quantitativas, em relação aos anexos sudoríparos, seriam necessárias para melhor comparar com os achados do presente estudo.

5.5 ALTERAÇÃO DE VASOS

Os resultados deste trabalho confirmam a alta frequência de alterações vasculares em pacientes com ES. Estiveram presentes em 67% dos casos e os vasos envolvidos foram tanto arteríolas como pequenas e médias artérias dermo-hipodérmicas.

Segundo FUREY et alii (1975) são os pequenos vasos sangüíneos os mais envolvidos nesta moléstia, sendo que o acometimento de grandes artérias é raro e as veias são poupadas.

Do ponto de vista histológico, as lesões vasculares na ES se caracterizam por proliferação concêntrica e espessamento mucóide da íntima, acompanhada de alterações discretas da média e fibrose da adventícia (GOETZ, 1945; NORTON & NARDO, 1970)

No presente estudo, a alteração vascular mais importante e consistente foi o espessamento fibroso da íntima com graus variados de redução da luz dos mesmos. Não se observaram trombose recente ou antiga, acúmulo de material mucóide na íntima, bem como necrose fibrinóide, comumente descritas em artérias arqueadas e interlobares renais de pacientes com ES (D'ANGELO et alii, 1969; CANNON et alii, 1974 ; TROSTLE et alii, 1988).

Segundo LAPENAS et alii (1978), a presença de arterite sob a forma de necrose fibrinóide é resultante da injúria mediada por imunecomplexos ou secundária à hipertensão grave.

RODNAN et alii (1980), em estudo de artérias digitais de pacientes com ES, constataram algum tipo de alteração vascular

em todos os vasos examinados, sendo que a fibrose da íntima foi o achado mais freqüente, seguida da presença de trombose.

A fibrose íntimal também é citada na ES por outros autores, comprometendo não somente vasos cutâneos como viscerais, principalmente a nível renal e pulmonar (D'ANGELO et alii, 1969; TROSTLE et alii, 1988 ; YOUNG & MARK, 1978).

Segundo O'LEARY (1957) os fenômenos vasculares na ES apresentam uma fase inicial, caracterizada por edema endotelial e da parede dos vasos, e outra final ou avançada, onde predominam os fenômenos de proliferação íntimal até o ponto de oclusão dos vasos, com ou sem recanalização.

Também PANJA et alii (1966) observaram o envolvimento de vasos cutâneos nesta doença, e caracterizaram como lesão inicial, a presença de edema da parede dos vasos e infiltrado inflamatório peri-vascular leve, sendo que, alterações da lâmina elástica interna e de estreitamento da luz ocorriam tardiamente no curso da doença. Para eles, as lesões vasculares ocorrem paralelamente às alterações do tecido conjuntivo dérmico.

Para FLEISCHMAJER (1977), as arteríolas e pequenas artérias são freqüentemente afetadas, e a alteração mais comum consiste na proliferação celular íntimal e deposição de colágeno.

Segundo BARNETT (1980), a gravidade da lesão vascular não necessariamente tem grau paralelo às alterações do colágeno dérmico, isto é, não parece que um é secundário ao outro, mas considera que ambos são causados por um fator comum, até hoje inexplicado.

Já RODNAN et alii (1980), devido à alta freqüência de lesões íntimais em pacientes esclerodérmicos com tempo variável

de doença e presença de fenômeno de Raynaud, sugerem que a fibrose intimal está relacionada com um metabolismo colágeno anormal, que leva ao espessamento da parede dos vasos e da pele desses indivíduos.

O tecido intimal proliferado nesse material mostrou padrões que variaram desde um tecido conjuntivo frouxo edematoso, até fibroso denso.

Para RODNAN et alii (1980), essas alterações distintas refletem apenas a idade das lesões. Esses autores também demonstram a presença de substância fundamental na íntima espessada e concluem que quanto maior for a quantidade desta substância mais recente é a fibrose intimal.

Praticamente não se detectaram elementos inflamatórios, a nível da íntima. A celularidade em geral era escassa, sendo que algumas células tinham características de células musculares lisas, ora lembrando fibroblastos, ora células mesenquimais indiferenciadas.

Para FLEISCHMAJER et alii (1976), a diferenciação das células endoteliais em fibroblastos ou em células "fibroblastos símile" seria a possível responsável pela deposição de colágeno intimal.

CAMPBELL & LE ROY (1975) têm reconhecido a presença de células com características de células musculares lisas na íntima de vasos lesados na ES, também denominadas de miointimais ou mioendoteliais, de reconhecidas propriedades fibrinogênicas. Uma vez na íntima, produziriam quantidades excessivas de componentes do tecido conjuntivo fibroso.

A origem dessas células musculares intimaais não está totalmente esclarecida. CAMPBELL & LE ROY (1975), consideram que essas células mioendoteliais migrem da camada média para a íntima através de poros ou lesões da membrana elástica interna.

Trabalhos experimentais de espessamento intimal e de aterosclerose apóiam essa mesma opinião (GEBRANE et alii, 1981 ; CAMPBELL & CHAMLEY-CAMPBELL, 1981 ; THOMAS & KIM, 1983).

Segundo esses autores, a migração de células musculares lisas da média para a íntima, seria estimulada por fatores quimiotáticos liberados pelas plaquetas que se aderem e se agrupam na área sem endotélio.

Entretanto, a origem das células mioendoteliais a partir de células indiferenciadas subendoteliais não pode ser descartada e vem sendo postulada por outros autores, através de estudos experimentais da íntima arterial aórtica de suínos e coelhos (LEE et alii 1970, LOPES DE FARIA, 1970). Também estudos recentes de ANDRADE & LOPES DE FARIA (1990) sobre o espessamento intimal espontâneo de aorta de coelhos, através de ultramicroscopia, demonstram numerosas células musculares lisas no espaço subintimal e em menor número, a presença de monócitos e células mesenquimais com diferenciação parcial para célula muscular lisa, o que vem apoiar a origem das células musculares lisas a partir da própria íntima.

A presença de agrupamento maior de células musculares lisas na íntima espessada, encontrada em um dos vasos neste estudo, foi interpretado como uma proliferação exacerbada dessas células, no processo de espessamento da íntima. Porém a

possibilidade dessas células serem residuais não pode ser totalmente descartada, podendo tratar-se de um vaso especial, ou seja, de um segmento inicial de anastomose artério-venosa ou esfíncter (SHERMAN, 1963), com lesão intimal.

O espessamento intimal não é uma lesão específica, podendo se observar alterações morfológicas semelhantes com etiologias distintas.

ALTEMANI & LOPES DE FARIA (1987) demonstraram, em estudo de vasos fetais placentários de natimortos e nativos normais, lesões da íntima semelhantes aos achados deste estudo, e propõem a seguinte seqüência de evolução dessas alterações: lesão da camada endotelial, edema subendotelial, proliferação subendotelial de células musculares lisas e fibrose.

Segundo FLEISCHMAJER & PERLISH (1980), em estudos de microscopia eletrônica, o que mais contribuiria para o espessamento da íntima é a formação de grandes "gaps" ou fendas entre as células por facilitar a difusão de elementos plasmáticos através da íntima. Esses elementos plasmáticos infiltrados, juntamente com a participação de elementos do sistema de coagulação (fator VIII, fibrinogênio e ativação plaquetária), propiciariam a formação de microtrombos e organização, com diminuição da luz vascular (KALLENBERG et alii, 1982).

Replicação da lâmina elástica interna foi o segundo achado mais importante e esteve presente em 16,2% dos vasos lesados, sendo que somente foi detectada em vasos com fibrose intimal avançada. Pequenas áreas de descontinuidade da mesma só

foram observadas focalmente.

Essas alterações da lâmina elástica interna também foram encontradas nos estudos de RODNAN et alii (1980) e PANJA et alii (1966).

Segundo ROBBINS et alii (1986), a duplicação da lâmina elástica interna ou a formação de novas fibrilas, denota aumento da formação de tecido elástico decorrente de esforços anormais do vaso, como na hipertensão.

Pode-se supor que a redução da luz produzida pelo espessamento intimal, bem como o espasmo paroxístico característico do fenômeno de Raynaud, presente em todos os casos, poderiam propiciar um regime de pressão intravascular elevada.

A camada média não mostrou alterações significantes, comparativamente aos controles. Também não se observaram fibrose cicatricial e evidências de inflamação pregressa.

A colageinização da camada média esteve presente em graus variados, e era mais proeminente nas artérias de maior calibre e nos indivíduos de idade avançada, tanto nos doentes como nos controles. Essa observação foi considerada como um achado de natureza fisiológica, relacionada ao envelhecimento do indivíduo. Segundo CRAWFORD (1977), metade do volume da artéria femoral pode sofrer colageinização aos 20 anos de idade e 75% até os 60 anos.

Observaram-se na camada média, áreas focais de atrofia em raras artérias com fibrose intimal grave, semelhante aos achados de RODNAN et alii (1980).

A caracterização segura de fibrose adventicial

mostrou-se de certa forma prejudicada, pois a proliferação colágena do estroma dermo-hipodérmico envolvente sobrepõe-se a esse achado. Foi reconhecido, com certa ressalva, em apenas dois vasos.

Telangiectasia dos "vasa vasorum" foi observada em dois vasos intensamente comprometidos, a maioria das artérias, pelo pequeno calibre, não apresentavam "vasa vasorum".

Vasculite tem sido descrita em poucos casos como complicação de ES, envolvendo principalmente órgãos internos (D'ANGELO et alii, 1969; LEE & HAYNES, 1967).

Relato mais recente de ODDIS et alii (1987), descreve sete casos de vasculite em ES, associado com síndrome de Sjögren, de padrão linfocitário e, às vezes, leucocitoclástico.

Neste trabalho, encontrou-se um único caso com vasculite linfocitária focal; a paciente não apresentava sinais clínicos de vasculite ou de síndrome de Sjögren na vigência da realização da biópsia. Parece ser um achado incidental sem outro significado.

5.6. INFILTRADO INFLAMATORIO

Infiltrado inflamatório esteve presente na avaliação histopatológica em apenas nove casos dentre os doentes (18,75%) e em nenhum dos controle.

A localização do infiltrado era predominantemente dérmica, peri-vascular e sempre de leve intensidade. A celularidade observada foi basicamente de mononucleares e com predomínio de linfócitos. Esses achados são concordantes com os da literatura (O'LEARY, 1957; FLEISCHMAJER et alii, 1972, 1977a; LEVER & LEVER, 1990).

Estudos de microscopia eletrônica (FLEISCHMAJER et alii, 1977b), têm demonstrado infiltrado inflamatório composto por linfócitos maduros, linfoblastos T, plasmócitos, macrófagos e monócitos. Já o trabalho de KONDO et alii (1976) revelou, através de estudo imuno-histoquímico, que o infiltrado inflamatório na ES é predominantemente, se não, somente de linfócitos T.

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS PRINCIPAIS ACHADOS HISTOPATOLOGICOS ENTRE SI E EM RELAÇÃO A PARAMETROS CLINICOS DA DOENÇA

MARKS (1981) enfatizou que a espessura da epiderme varia em função da idade, do local da biópsia e do estado nutricional. Essa observação pode ser constatada e comprovada estatisticamente neste trabalho, através do resultado obtido com os casos controle em relação à idade e ao peso (parâmetro considerado na abordagem do estado nutricional), onde se observou adelgaçamento da epiderme em função do aumento da idade e do decréscimo de peso. Não houve correlação em relação aos doentes.

Para FLEISCHMAJER et alii (1972) não existe boa correlação entre atrofia da epiderme e duração da doença. Já neste trabalho, pode-se observar e confirmar estatisticamente o achatamento das cristas epidérmicas em função do tempo de doença, apoiando as descrições de PINKUS & MEHREGAN (1976), ROOK et alii (1979).

Quanto ao distúrbio de pigmentação, constatou-se que a sua ocorrência independe de fatores tais como: proliferação de fibras colágenas, forma clínica e estadiamento clínico da ES.

A pele normalmente varia em espessura em função da topografia, bem como em adição a outros fatores tais como: sexo, idade, estado nutricional e ocupação, os quais têm sido motivo de extensa investigação (ARHO, 1972; SHUSTER et alii, 1975).

Neste estudo observou-se, através da análise estatística, uma correlação negativa entre a quantidade de fibras colágenas totais e a idade nos controles, ou seja, com o aumento da idade há uma diminuição da quantidade do colágeno,

porém, não houve correspondência em relação aos doentes.

O estado nutricional foi indireta e parcialmente avaliado através do peso e estatisticamente houve correlação entre a variação do peso e a quantidade de fibras colágenas somente nos controles, ou seja, com o aumento progressivo do peso detectou-se aumento correspondente na quantidade de fibras colágenas totais.

Não se verificou correspondência entre a quantidade de fibras colágenas nos doentes e tempo de doença. Encontraram-se valores elevados na avaliação da proliferação de fibras colágenas (método quantitativo e qualitativo), tanto em pacientes com um ano até 26 anos de doença. Bem como observaram-se valores baixos na avaliação da proliferação de fibras colágenas, com tempo de doença extremamente variável.

RODNAN et alii (1979) também demonstraram pele com peso elevado e anormalmente espessada em pacientes com tempo de doença tanto curto quanto longo, isto é, variando de seis meses a 14 anos.

Não se verificou diferença significativa entre as formas clínicas inflamatória e a não inflamatória em relação à proliferação de fibras colágenas (métodos: quantitativo e qualitativo). Com base neste resultado, pode-se dizer que a biópsia, através da observação da proliferação de fibras colágenas, por esses métodos, não contribui na identificação das formas clínicas da ES.

Também não houve diferença significativa entre a intensidade de proliferação de fibras colágenas e o

estadiamento clínico nos seus vários graus. Conclui-se que a expressão histológica em relação à proliferação colágena nesta doença, pode ter intensidade variável e independe da extensão do comprometimento cutâneo e visceral.

A idéia de uma possível atrofia dos anexos sudoríparos conseqüente a um estrangulamento, secundário à proliferação colágena, não foi confirmada neste estudo. A maior alteração observada foi a substituição do tecido adiposo periglandular sudoríparo por colágeno. Acredita-se que eventual atrofia dos anexos possa ser constatada, aumentando o número de casos com grau extremo de proliferação colágena.

O presente estudo apoia os resultados obtidos por BARNETT (1980), isto é, a intensidade das lesões vasculares não é diretamente proporcional ao grau de espessamento ou proliferação colágena dermo-hipodérmica, comprovada pela análise estatística. Parece que um é independente do outro, porém, causados provavelmente por um fator comum.

Também demonstrou-se que a lesão vascular não sofreu variações em função da idade e tempo de doença, conforme observado por RODNAN et alii (1980).

Este trabalho mostrou que não houve diferença significativa entre a presença de lesões vasculares e forma clínica, porém constatou uma tendência à maior incidência de lesões vasculares nos pacientes com a forma clínica inflamatória da ES. Esse resultado, de certa forma, vem de encontro com a própria definição desta forma clínica, também denominada predominantemente vascular, bem como, vem apoiar a classificação proposta por MARQUES NETO & SAMARA (1985).

O estudo de TROSTLE et alii (1988) demonstrou maior comprometimento vascular renal em pacientes com ES forma inflamatória, do que na forma não-inflamatória.

A baixa frequência e intensidade do infiltrado inflamatório não permite correlacioná-lo com as demais variáveis clínicas e histológicas no presente estudo.

Segundo FLEISCHMAJER et alii (1977a), a presença ou a intensidade do infiltrado celular não tem correlação com a duração da doença ou com anormalidades sorológicas, tanto na forma localizada como na forma sistêmica da esclerodermia.

6 PRINCIPAIS CONCLUSÕES

1- A epiderme não é atrófica nem retificada na ES e os cones epiteliais são proeminentes comparativamente aos controles, podendo sofrer redução na sua espessura, em função do tempo de doença.

2- O distúrbio de pigmentação melânica, presente em 54,16% dos doentes e em nenhuma dos controles, sugere que, mesmo sendo um achado histopatológico inespecífico, deve ser valorizado quando presente, podendo contribuir para o diagnóstico da ES, especialmente, quando os demais achados histopatológicos são discretos.

3- A proliferação de fibras colágenas é o achado histopatológico mais notável e consistente na pele dos doentes com ES, comparativamente aos controles.

4- Tanto o método quantitativo como o qualitativo podem ser utilizados na avaliação da fibrose.

5 - A maior diferença observada no terço inferior, quanto à proliferação de fibras colágenas entre doentes e controles, mostra a importância da biópsia incluir o hipoderma para a correta avaliação da fibrose.

6 - Considerando-se que o método quantitativo, proposto na avaliação da proliferação das fibras colágenas, mostrou ser de fácil utilização e sensível, para se medir a intensidade do envolvimento cutâneo na ES, parece-nos que este método poderá ser de grande valia na avaliação de respostas terapêuticas, bem como parâmetro da evolução natural desta doença.

7 - A proliferação de fibras colágenas e a lesão vascular (caracterizada basicamente pelo espessamento da íntima) apresentam graus variados de intensidade, não proporcionais entre si e independentes do tempo de doença e da extensão do comprometimento cutâneo e visceral, bem como não contribuem na identificação das formas clínicas da ES.

8 - A proliferação colágena e a alta freqüência de lesões vasculares, nos achados histopatológicos, comprovam ser as alterações fundamentais ou marcas da ES, consolidando a própria definição desta doença.

7 REFERÊNCIAS

- ABERER, E.; STANEK, G.; ERTL, E. & NEUMANN, R. Evidence for spirochetal origin of circumscribed scleroderma (Morphea). *Acta. Derm. Venereol. (Stockh)*. 67:225-231, 1987.
- ALTEMANI, A.M. & LOPES DE FARIA, J. Non-Trombotic changes of fetal placental vessels in stillbirths. *Pathol. Res. Pract.* 182:676-684, 1987.
- AMSTALDEN, E.M.I.; BERTOLO, M.B. & MARQUES NETO, J.F. A propose of histologic graduation of cutaneous involvement in progressive systemic sclerosis (Scleroderma). In: International League Against Rheumatism Congress of Rheumatology, 17, Rio de Janeiro, 1989. *Abstracts Rio de Janeiro, 1989*, p.288.
- ANDRADE, L.A.L.A. & LOPES DE FARIA, J. Light and electron microscopy of the spontaneous intimal thickening of rabbit aorta. A normal arterial wall growth. *Pathol. Res. Pract.* 186:167-172, 1990.
- ARHO, P. Skin thickness and collagen content in some endocrine, connective tissue and skin diseases. A roentgenografic and biochemical study. *Acta. Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)*. 52:7-48, 1972.

- BARNETT,A.J. The skin changes in scleroderma (Systemic Sclerosis). *Australas J. Dermatol.* 21: 142-150,1980.
- BIRNBAUM,N.S. ; RODNAN,G.P. ; RABIN,B.S. & BASSION,S. Histocompatibility antigens in progressive systemic sclerosis (Scleroderma). *J. Rheumatol.* 4:425-428, 1977.
- BLACK,C.M. ; WELSH,K.I. ; MADDISON,P.J. ; JAYSON,M.V. & BIRNSTEIN,R.M. HLA antigens, autoantibodies and clinical subsets in scleroderma. *Br. J. Rheumatol.* 23:267-271,1984.
- BLACK,M.M. ; BOTTOMS,M. & SHUSTER,S. Skin collagen content and thickness in systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol.* 83:552-555,1970.
- BRADY,A.H. Collagenase in Scleroderma. *J. Clin. Invest.* 56:1175-1180,1975.
- BUCKINGHAM,R.B. ; PRINCE,R.K. & RODNAN,G.P. Increased collagen accumulation in dermal fibroblast cultures from patients with progressive systemic sclerosis (Scleroderma). *J. Lab. Clin. Med.* 92:5-21,1978.
- BULKLEY,B.H. ; RIDOLFI,R.L. ; SCLYER,W.R. & HUTCHINS,G.M. Myocardial lesions of progressive systemic sclerosis. A cause of cardiac dysfunction. *Circulation* 53:4438-490,1976.

CAMPBELL,P.M. & LE ROY,E.C. Pathogenesis of systemic sclerosis : vascular hypothesis. **Semin. Arthritis Rheum.** 4:351-368,1975.

CAMPBELL,G.R. & CHAMLEY-CAMPBELL,J.H. The cellular pathobiology of atherosclerosis. **Pathology** 13:423-440,1981.

CANNON,P.J. ; HASSER,M. ; CASE,D.H. ; CASARELLA,W.J. SOMMERS,S.C. & LE ROY,E.C. The relationship of hypertension and renal failure in scleroderma (progressive systemic sclerosis) to structural and functional abnormalities of the renal cortical circulation. **Medicine (Baltimore)** 53:1-46,1974.

CANTWELL,Jr.A.R. & KELSO,D.W. Acid-fast bacteria in scleroderma and morphea. **Arch. Dermatol.** 104:21-25,1971.

CATOGGIO,L.J. ; BERNSTEIN,R.M.& BLACK,C.M. Serological markers in progressive systemic sclerosis : clinical correlations. **Ann. Rheum. Dis.** 42:23-27,1983.

CLAMAN,H.N. Mast cells and fibrosis: the relevance to scleroderma. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.** 16:141-151,1990.

CRAWFORD,S.T. Blood and lymphatic vessels. In : ANDERSON,W.A.D. & KISSANE,J.M.,ed. **Pathology** 17a Ed. Saint Louis, The C. V. Mosby Company, 1977. p.881-883.

- CROMBRUGGHE,B.; VUORIO,T.&KARSENTY,G. Control of type I collagen genes in scleroderma and normal fibroblasts *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 16:109-123,1990.
- CURZIO,C. Discussioni anatomico-pratiche di un raro, e stravagante morbo cutaneo in una giovane donna felicemente curato in questo grande ospedale degl' incurabili, Giovanni di Simone, Napoli, 1753 apud RODNAN,G.P. & BENEDECK,T.G., 1962,p.305-307.
- D' ANGELO,W.A. ; FRIES,J.F. ; MASI,A.T. & SHULMAN,L.E. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). *Am. J. Med.* 46:428-440,1969.
- EHRESMANN,G.R. ; BAKKE,A.C. ; HORWITZ,D.A. T cell subsets in progressive systemic sclerosis (abstract). *Arthritis Rheum.* 25:45,1982.
- ERCILLA,M.G.;ARRIAGA,F.& GRATACOS,M.R. HLA antigens and scleroderma. *Arch. Dermatol. Res.* 271:381-385,1981.
- FINCH,W.R. ; RODNAN,G.P. ; BUCKINGHAM,R.B. ; PRINCE,R.K & WINKELSTEIN,A. Bleomycin-induced scleroderma. *J. Rheumatol.* 7:651-659,1980.
- FISHER,E.R. & RODNAN,G.P. Pathologic observations concerning the cutaneous lesion of progressive systemic sclerosis : An electron microscopic, histochemical and immunohistochemical study. *Arthritis Rheum.* 3:536-545,1960.

FLEISCHEMAJER,R. The collagen in scleroderma. Arch. Derm. 89:437-441,1964.

FLEISCHEMAJER,R. & KROL, S. Chemical analysis of the dermis in scleroderma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126:252-256,1967.

FLEISCHEMAJER,R.; DAMIANO,V. & NEDWICH,A. Alterations subcutaneous tissue in systemic scleroderma. Arch. Dermatol. 105:59-66,1972.

FLEISCHEMAJER,R. & PERLISH,J.R. Glicosaminoglycans in scleroderma and scleredema. J. Invest. Dermatol. 58:129-132,1972.

FLEISCHEMAJER,R. ; PERLISH,J.S.; SHAW,K.V. & PIROZZI,D.J. Skin capillary changes in early systemic scleroderma. Arch. Dermatol. 112:1553-1557,1976.

FLEISCHEMAJER,R. The pathophysiology of scleroderma. Int. J. Dermatol. 16:310-318,1977.

FLEISCHEMAJER,R. ; PERLISH,J.S. & REEVES,J.R.T. Cellular infiltrates in scleroderma skin. Arthritis Rheum. 20:975-984,1977a.

FLEISCHEMAJER,R. ; PERLISH,J.S. & WEST,J.F. Ultrastructure of cutaneous cellular infiltrates in scleroderma. Arch. Dermatol. 113: 1661-1666,1977b.

FLEISCHEMAJER,R.& PERLISH,J.S. Capillary alteration in scleroderma. *J.Am. Acad. Dermatol.* 2:161-170,1980.

FLEISCHEMAJER,R. ; DESSAU,W.T. ; TIMPL,R. ; KRIEG,T.; LEIDERSCHMIDT,C. & WIESTNER,M. Immunofluorescence analysis of collagen, fibronectin and basement membrane protein in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.* 75:270-274,1980a.

FLEISCHEMAJER,R. ; KRIEG,T.; TIMPL,R. & PERLISH,J.S. Heterogeneity of collagen and fibronectin synthesis by scleroderma fibroblasts isolated from various skin levels. *Arthritis Rheum.* 23:673-674,1980b.

FLEISCHMAJER,R. ; KKRIEG T. & TIMPLE,R. Variability in collagen fibronectin synthesis by scleroderma fibroblasts in primary culture. *J. Invest. Dermatol.* 76:400-403,1981.

FOERSTER,A. Zur pathologischen anatomie des scleroma der haut bei erwachsenen. *Wurzb. Med. Z.* 2:294,1861
apud RODNAN,G.P. & BENEDEK,T.G., 1962, p.314.

FRITZLER,M.J. & KIMSELLA,T.D. The CREST syndrome :a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am. J. Med.* 69:520-526,1980.

FUREY,N.L. ; SCHMID,F.R. ; KWAAN,H.C. & FRIEDERICI,H.H.R. Arterial thrombosis in scleroderma. *Br. J. Dermatol.* 93:683-692,1975.

GALEN. Causes and treatment of constriction of the pores, in: **A translation of Galen's hygiene (De Sanitate Tuenda)**, ed. by GREEN,R.M., CHARLES G. THOMAS, Springfield, Illinois, 1951, p.131 apud RODNAN,G.P. & BENEDEK,T.G., 1962, p.305.

GARRET, J.M. ; WINKELMANN, R.K. ; SCHLEGEL, J.F.& CODE, C.F. Esophageal deterioration in scleroderma. **Mayo Clin. Proc.** 46:92-96,1971.

GEBRANE,J. ; ROLAND, J. & ORCEL,L. Experimental diffuse intimal thickening of the femoral arteries of the rabbit. **Virchows Arch. [A]** 396:41-59, 1981.

GERMAIN,B. ; ESPINOZA,L.R. ; VAGESH,M. & VASEY,F.B. Increased prevalence of DRW3 in the CREST syndrome. **Arthritis Rheum.** 24:857-859,1981.

GINTRAC,E. Note sur la sclerodermie. **Rev. Med.Chir. (Paris)** 2:263,1847. apud Rodnan,G.P. & Benedeck, T.G., 1962, p.307.

GLADMAN,D.D. ; KEYSTONE,E.C. ; BARON,M. ; LEE,P. ;CANE, D. & MERVET,H. Increased frequency of DR5 in scleroderma. **Arthritis Rheum.** 24:854-856,1981.

GOETZ,R.H. Pathology of progressive systemic sclerosis (Generalized scleroderma) with special reference to changes in the viscera. **Clin. Proc.**4:337-392,1945.

GREGGER,R.E. Familial progressive systemic scleroderma
Arch. Dermatol. 111:81-85,1975.

HAUSTEIN,U.F. & ZIEGLER,V. Environmentally induced
systemic sclerosis like disorders. Int.J. Dermatol.
24:147-151,1985.

HAUSTEIN,U.F. ; HERRMANN,K. & BOHNE,H.J. Pathogenesis
of progressive systemic sclerosis.Int. J. Dermatol.
25:286-293,1986.

HAYES,R. & RODNAN,G.P. The ultrastructure of skin in
progressive systemic sclerosis (scleroderma). Am.
J. Pathol. 63:433-440,1971.

HERRMANN,K. ; HAUSTEIN,U.F. ; BOHME,H. & LOHRISCH,I.
Acid lysosomal hydrolases in systemic sclerosis and
other connective tissue diseases. Br. J. Dermatol.
106:523-528,1982.

JABLONSKA,S.; CHORZELSKI,T. & BLASZEZYK,M. In:
JABLONSKA,S.,ed. Scleroderma and pseudoscleroderma.
Warsaw, Polish Medical Publishers, 1975, p. 15-35
apud FLEISCHMAJER,R., 1977,p.315.

JOHNSON,R.L. & ZIFF,M. Lymphokine stimulation of
collagen accumulation.J.Clin.Invest. 58:240-252,1976

KAHALEH,M.B. Vascular disease in scleroderma.
Endotelial T lymphocyte-fibroblast interactions.
Rheum. Dis. Clin. North. Am. 16:53-73,1990.

- KALLENBERG,C.G. ; VELLENGA,E. ; WOUDA,A.A. & THE,T.H.
Platelet activation, fibrinolytic activity and
circulating immune complexes in Raynaud's phenomenon
J. Rheumatol. 9:878-884,1982.
- KAPOSI,M. Scleroderma adultorum. In: On diseases of
the skin, inducing the exanthemata, vol.3, by HEBRA,
F. & KAPOSI, M., translated by TAY,W. The New
Sydenham Society, London, 1874, p.104. apud RODNAN,
G.P. & BENEDEK,T.G., 1962, p.315.
- KLAUS,S.N. The biologic basis of right unusual hypo-
pigmentary disorders. Ala. J. Med. Sci. 16:280-
304,1979 apud SANCHEZ,J.L. ; VAZQUEZ,M. & SANCHEZ,
N.P., 1983, p.129.
- KEISER,H.R. ; STEIN,D. & SJOERDSMA,A. Increased
protocollagen prolin hydroxylase activity in
sclerodermatous skin. Arch. Dermatol. 104:57-60,
1971.
- KLEMPERER,P. ; POLLACK,A.D. & BAEHR,G. Diffuse
collagen disease. Acute disseminated lupus
erythematosus and diffuse scleroderma. J.A.M.A. 119:
331-332,1942.
- KONDO,H. ; RABIN,B.S. & RODNAN,G.P. Cutaneous antigen
stimulating lymphokine production by lymphocytes of
patients with progressive systemic sclerosis
(scleroderma). J. Clin. Invest. 58:1388-1394,1976.

KRAKAUER,R.S. ; SUNDEEN,J. ; SANDER,D.N. & SCHERBEL,A.
Abnormalities of immuno regulation in progressive
systemic sclerosis: evidence for excess helper-cell
function and altered B-cell function. **Arch.
Dermatol.** 117:80-82,1981.

LAITINEN,O. ; VITTO,J. ; HANNUKSELA,M. & MUSTAKALLIO,K.
Solubility and turnover of collagen in collagen
diseases. **Ann. Clin. Res.** 1:64-73,1969.

LAPENAS,D. ; RODNAN,G.P. & CAVALLO,T. Immunopathology
of the renal vascular lesion of progressive systemic
sclerosis (scleroderma). **Am. J. Pathol.** 91:243-
256,1978.

LEE,J.E. & HAYNES,J.M. Carotid arteritis and cerebral
infarction due to scleroderma. **Neurology** 17:18-22,
1967.

LEE,K.T. ; LEL,K.J. ; IMAI,H. & O'NEAL,K.N. Poorly
differentiated subendotelial cells in swine aortas.
Exp. Mol. Pathol. 13:118-129,1970.

LE ROY,E.C. Increased collagen synthesis by sclero-
derma skin fibroblasts in vitro. **J. Clin. Invest.**
54:880-889,1974.

LE ROY, E.C.; BLACK, C.; FLEISCHMAJER, R.; JABLONSKA, S.; KRIEG, T. ; MEDSGER JR, T.A. ; ROWELL, N. & WOLLHEIN, F. Scleroderma (Systemic Scleroderma) : classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 15:202-204, 1988.

LEVER, W.F. & SCHAMBERG-LEVER, G. Scleroderma. In: *Histopathology of the skin.* 7th Ed. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1990. p511-522.

LEWIS, T. & PICKERING, G.W. Observations upon maladies in which the blood supply to digits ceases intermittently or permanently and upon bilateral gangrene of digits; observations relevant to so-called "Raynaud's disease". *Clin. Sci.* 1:327-366, 1934 apud RODNAN, G.P.; MYEROWITZ, R.L. & JUSTH, G.O. 1980, p.393.

LIVINGSTON, J.Z. ; SCOTT, T.E. ; WIGLEY, F.M. ; ANHALT, G. J. ; BIAS, W.B. ; Mc LEAN, R.H. & HOCHBERG, M.C. Systemic sclerosis (scleroderma): clinical, genetic and serologic subsets. *J. Rheumatol.* 14:512-518, 1987.

LOPES DE FARIA, J. On the origin of smooth muscle cells in the intimal thickening of rabbit aorta following orthostatic collapse. *Beitr. Path. Anat.* 140:333-344, 1970.

- LOVELL,C.R. ; NICHOLLS,A.C. ; DUANCE,V.C. & BAILEY,A.J.
 Characterization of dermal collagen in systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol.* 100:359-380,1979.
- LYNCH,C.J. ; SINGH,G. & WHITESIDE,T.L. Histocompatibility antigens in progressive systemic sclerosis (PSS scleroderma). *J. Clin. Immunol.* 2:314-318,1982.
- MARKS,R. Mensurement of biological ageing in human epidermis. *Br. J. Dermatol.* 104:627-633,1981.
- MARQUES NETO,J.F. Importância dos níveis séricos de renina e do acometimento de vias urinárias na lesão renal da esclerose sistêmica. Campinas, 1984. 75p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.
- MARQUES NETO,J.F. & SAMARA,A.M. Esclerodermia. In SAMARA,A.M., ed. *Reumatologia*. São Paulo, Savier, 1985. p.258-307.
- MASUGI,M. & YA-SHU. Die diffuse sklerodermia und ihre gefassveranderung. *Virchow. Arch. Path. Anat.* 302:39,1938. apud RODNAN,G.P. & BENEDECK,T.G., 1962, p.314.
- MAUCH,C. & KRIEG,T. Fibroblast - matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 16:93-107,1990.

MATSUI,S. Uber die pathologie und pathogenese von
scleroderma universalis. Mitt. Med. Fakvet.
Kaiserl. Univ. Tokyo 31:55,1924. apud RODNAN,G.P.
& BENEDEK,T.G., 1962, p.315.

MEDSGER Jr,T.A. Systemic sclerosis (scleroderma),
localized scleroderma, eosinophilic fascitis and
calcinosis. In: Mc CARTY,D.J., ed. Arthritis and
allied conditions. 11a Ed. Philadelphia, Lea &
Febiger, 1989. p1118-1165.

MEDSGER Jr,T.A. & MASI,A.T. Epidemiology of systemic
sclerosis (scleroderma). Ann. Intern. Med. 74:714-
721,1971.

MORLEY,S.M. ; GAYLARDE,P.M. & SARKANY I. Epidermal
thickness in systemic sclerosis and morphea. Clin.
Exp. Dermatol. 10:51-57,1985.

NELDNER,K.H. ; JONES,J.D. & WINKELMANN,R.K. Sclero-
derma: dermal amino acid composition with particular
reference to hydroxyproline. Proc. Soc. Exp. Biol.
Med. 122:39-41,1966.

NISHIMURA,N. ; YASUI,M. ; OKAMOTO,H. ; KANAZAWA,M. ;
KOTAKE,Y. & SHIBATA,Y. Intermediary metabolism of
phenylalanine and tyrosine in diffuse collagen
diseases. The presence of 2,5 dihydroxyphenyl-
pyruvic acid in the urine of patients with collagen
disease. Arch. Derm. 77:255-262,1958.

NORTON,W.L. & NARDO,J.M. Vascular disease in progressive sclerosis (scleroderma). *Ann. Intern. Med.* 73:317-324,1970.

ODDIS,C.V. ; EISENBERG JR,C.H. ; REIDBORD,H.E. ; STEEN, V.D. & MEDSGER JR,T.A. Vasculitis in systemic sclerosis: association with Sjogren's syndrome and the CREST syndrome variant. *J. Rheumatol.* 14:942-948,1987.

O'LEARY,P.A. ; MONTGOMERY,H. & RAGSDALE,W.E. Dermato-histology of various types of scleroderma. *Arch. Derm.* 75:78-87,1957.

ORTONNE,J.P. & PERROT,H. Scleroderma: ultrastructural study of the melanin pigmentary disturbances of the skin. *Clin. Exp. Dermatol.* 5:13-25,1980.

OSLER,W. On diffuse scleroderma with special reference to diagnosis and the use of thyroid-gland extract. *J. Cutan. Genito-Urin. Dis.* 16:49,127,1898. apud RODNAN,G.P. & BENEDECK,T.G., 1962, p.311.

PANJA,R.K. ; SENGUPTA,K.P. & AIKAT,B.K. Vascular changes in the cutaneous lesions of lupus erythematosus and scleroderma. *Br. J. Derm.* 78:34-42,1966.

PIERARD,G.E. Histological and reological grading of cutaneous sclerosis in scleroderma. *Dermatologica* 179:18-20,1989.

POSTLETHWAITE,A.E. Early immune events in scleroderma
Rheum. Dis. Clin. North. Am. 16:125-139,1990.

PINKUS,H. & MEHREGAN,A.H. Scleroderma. In: *A guide to dermatohistopatology*, 2a Ed. New York, Appleton Century Crofts, 1976. p359-363.

REED,R.J. ; CLARK,W.H. & MIHM,M.C. The cutaneous collagenoses. *Hum. Pathol.* 4:165-186,1973.

ROADS,R.E. & HUTTON Jr,J.J. Factors wich stimulate collagen proline hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys* 122:805-807,1967.

ROBBINS,S.L. ; COTRAN,R.S. & KUMAR,V. *Patologia estrutural e funcional* 3a Ed.,1984. Trad. de Zilton A. Andrade e Manoel Barretto Netto. Rio de Janeiro, Guanabara, 1986. p.488.

RODNAN,G.P. & BENEDEK,T.G. An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Annals. Int. Med.* 57:305-319,1962.

RODNAN,G.P. The natural history of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Bull. Rheum. Dis.* 13:301-304,1963.

RODNAN,G.P. Progressive systemic sclerosis: Clinical features and pathogenesis of cutaneous involvement (scleroderma). *Clin. Rheum. Dis.* 5:49-79,1979.

RODNAN,G.P.; LIPINSKI,E. & LUKSICK,J. Skin thickness and collagen content in progressive systemic sclerosis and localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 22:130-140,1979.

RODNAN,G.P.; MYEROWITZ,R.L. & JUSTH,G.O. Morfologic changes in the digital arteries of patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma) and Raynaud phenomenon. *Medicine* 90:393-408,1980.

ROOK,A. ; WILKINSON,D.S. & EBLING,F.J.G. Text book of dermatology, 2a Ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1972. p1102-1118.

ROWELI,N.R. & SCOTT,D.G. Immunohistological studies, with anti-connective tissue and anti-immunoglobulin antisera, of the skin in lupus erythematosus and scleroderma. *Br. J. Dermatol.* 93:431-441,1975.

SANCHEZ,J.L. ; VAZQUEZ,M. & SANCHEZ,N.P. Vitiligolike macules in systemic scleroderma. *Arch. Dermatol.* 119:129-133,1983.

SHERMAN,J.L. Normal arteriovenous anastomoses. *Medicine (Baltimore)* 42:247-267,1963.

SHIBESHI,D. ; BLASZCZYK,M. ; JARZABEK-CHORZELSKA,M. ; JABLONSKA,S. & CHORZELSKI,T. Immunopathologic findings in systemic sclerosis patients. *Int. J. Dermatol.* 28:650-656,1989.

- SHUSTER,S. ; BLACK,M.M. & Mc VITIE,E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br. J. Dermatol.* 93:639-643,1975.
- SMITH,A.G. ; HOLTI,G. & SHUSTER,S.A.M. Immunoreactive beta-melanocyte stimulating hormone and melanin pigmentation in systemic sclerosis. *Br. Med. J.* 2: 733-734,1976.
- STACHOW,A. Disorders of phenylalanine metabolism. In JABLONSKA,S.,ed. *Scleroderma and Pseudoscleroderma*. Warsaw, Polish Medical Publishers, 1975, p105-110 apud ORTONNE,J.P. & PERROT,H., 1980, p.23.
- STEEN,V.D. & MEDSGER JR,T.A. Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 16:1-10,1990.
- THOMAS,W.A. & KIM,D. Atherosclerosis as a hiperplastic and/or neplastic process. *Lab. Invest.* 48:245-255, 1983.
- TROSTLE,D.C. ; BEDETTI,C.D. ; STEEN,V.D. ; AL-SABBAGH, M.R. ; ZEE,B. & MEDSGER,T.A. Renal vascular histology and morphometry in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 31:393-400,1988.
- TUFFANELLI,D.L. Systemic scleroderma. *Med. Clin. N. Am.* 73:1167-1180,1989.

TUFFANELLI, D.L. & WINKELMANN, R.K. Systemic scleroderma:
A clinical study of 727 cases. Arch. Dermatol. 84:
359-371, 1961.

WOLTERS, M. Beitrag zur kenntniss der sclerodermie.
Arch. Dem. Syph. 24:695-943, 1892 apud RODNANN, G.
P. & BENEDEK, T.G., 1962, p.305.

WUTBRICH, R.K. ; ROENIGK, H. & STECK, W.D. Localized
cleroderma. Arch. Dermatol. 111:98-100, 1975.

YOUNG, R.H. & MARK, G.J. Pulmonary vascular changes in
scleroderma. Am. J. Med. 64:998-1004, 1978.

(*) Consultoria:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Referências
bibliográficas: NB-66. Rio de Janeiro, 1977. 35p.

CUNHA, A.C. Estrutura e apresentação de dissertações e teses.
São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina.
Serviço de Biblioteca e Documentação, 1991. 48p.