

# **QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD34 POSITIVAS NA PELE DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA**

**Ana Paula de Sá Earp**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Dermatologia).

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Coelho da Silva Carneiro

Prof. Dr. Absalom Lima Filgueira

Prof. Dr. Luiz Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

Rio de Janeiro

Agosto/2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD34 POSITIVAS NA PELE DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

Ana Paula de Sá Earp

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Coelho da Silva Carneiro

Prof. Dr. Absalom Lima Filgueira

Prof. Dr. Luiz Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Dermatologia).

Aprovada por:

---

Presidente, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nurimar Conceição Fernandes

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cecília da Fonseca Salgado

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana de Carvalho Corrêa

Rio de Janeiro

Agosto/2006

Earp, Ana Paula de Sá

Quantificação das células CD34 positivas na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica/ Ana Paula de Sá Earp. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2006.

xiii, 78 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Sueli Coelho da Silva Carneiro, Absalom Lima Filgueira e Luiz Cristóvão de Moraes Sobrino Porto.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina / Dermatologia, 2006.

Referências Bibliográficas: f. 62-75

1. Esclerose Sistêmica. 2. CD34. 3. Matriz Extracelular. 4. Dermatologia – Tese. I. Carneiro, Sueli Coelho da Silva. Filgueira, Absalom Lima. Porto, Luiz Cristóvão de Moraes Sobrino. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina. III. Título.

**Aos meus pais, Maria Teresa e Pedro Paulo, pelo amor e carinho com que me cercaram durante toda a vida e pelo incentivo e apoio em todos os momentos.**

**Aos meus irmãos, Pedro Henrique e George Eduardo, por serem, além de irmãos, meus grandes amigos.**

**Ao amado Felipe por tornar minha vida mais feliz e mais alegre, por acreditar em mim e por toda a ajuda.**

## AGRADECIMENTOS

---

Ao curso de Pós-Graduação em Dermatologia da UFRJ, pela oportunidade de realização deste mestrado.

À orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Coelho da Silva Carneiro pelo apoio incondicional em todos os momentos. Seu entusiasmo pelos projetos e sua luta para realizá-los são um exemplo que nos dá força para seguirmos em frente.

Ao orientador Prof. Dr. Luiz Cristóvão de Moraes Sobrino Porto por me aceitar em sua linha de pesquisa e por toda a ajuda que me deu em todos os aspectos da realização deste projeto. Foi uma honra e um prazer ter feito parte da sua equipe.

Ao orientador Prof. Dr. Absalom Lima Figueira por incitar nos alunos desta pós-graduação o espírito do verdadeiro pesquisador.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cecília da Fonseca Salgado por ter começado este trabalho e por me ceder de modo tão abnegado grande parte do material utilizado nesta tese. Espero que este novo trabalho ajude a valorizar ainda mais todo o esforço empreendido na obtenção deste material.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Monte Alto Costa pelo incentivo, pelo auxílio prestado na concretização deste trabalho e por ser sempre tão atenciosa e disponível para minhas inúmeras dúvidas.

À Adriana Paulino do Nascimento pela inestimável ajuda nas incontáveis sessões de imunistoquímica, na quantificação das células, na análise estatística, na redação do projeto e na elaboração dos gráficos. Sem sua contribuição este projeto não seria possível. Espero um dia poder retribuir seu esforço.

A toda a equipe do laboratório de Histologia e Embriologia da UERJ, especialmente a Bruna Romana e a Thaís Amadeu, não apenas pela ajuda técnica como pelo carinho com que me receberam no laboratório.

À Dionne da Encarnação Lorena pela ajuda na elaboração do projeto e na realização das biópsias.

Às amigas Daniela Pereira Antelo e Clarice de Oliveira Martins pela amizade e pelo companheirismo. Por terem me incentivado a seguir este caminho e por tê-lo percorrido ao meu lado.

Às secretárias do curso de pós-graduação em Dermatologia Gilsara Jaccoud da Costa e Deise Pereira da Cunha por serem tão gentis, pacientes e prestativas nas incontáveis vezes em que as solicitei.

Aos amigos Flávia, Eduardo, Arles, Fátima, Camila, Marilza, Maria Augusta, Fabíola e Simone. Fazer parte deste grupo tornou esta jornada mais fácil e mais prazerosa.

## RESUMO

---

### QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD34 POSITIVAS NA PELE DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

Ana Paula de Sá Earp

Orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sueli Coelho da Silva Carneiro

Prof. Dr. Absalom Lima Filgueira

Prof. Dr. Luiz Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Dermatologia).

**Fundamentos:** Estudos recentes sugeriram que as células dérmicas CD34 positivas estão diminuídas na pele de pacientes com Esclerodermia e que estas células podem ter um papel importante na patogênese desta doença.

**Objetivos:** Localizar e quantificar as células CD34 positivas na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica e correlacionar o número destas células com o tempo de evolução da doença e com o grau de fibrose.

**Material e métodos:** Nós analisamos o número de células CD34 positivas por imunohistoquímica, usando anticorpos anti-CD34 e cortes de pele incluídos em parafina de 26 pacientes com Esclerose Sistêmica e 10 indivíduos saudáveis. A contagem do número de células foi realizada em 5 campos aleatórios da derme papilar e 5 campos da derme reticular. A contagem foi feita por dois observadores independentes.

**Resultados:** As células CD34 positivas localizaram-se na derme, sendo mais numerosas na derme reticular que na derme papilar. Observou-se uma redução acentuada no número de células CD34 positivas na pele dos pacientes com Esclerose Sistêmica. Isto ocorreu precocemente, já sendo notada redução nos pacientes com 1 ano ou menos de doença. A diminuição das células CD34 positivas precedeu o aparecimento de fibrose intensa.

**Conclusão:** As células CD34 positivas localizam-se predominantemente na derme reticular e estão diminuídas na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica. Essa diminuição ocorre muito precocemente na evolução da doença. Não há correlação estatisticamente significativa entre o grau de fibrose e a quantidade de células CD34 positivas.

**Palavras-chave:** Escleroderma Sistêmico – Antígenos CD34 – Matriz Extracelular

Rio de Janeiro

Agosto/2006

## ABSTRACT

---

### QUANTIFICATION OF CD34 POSITIVE-CELLS IN THE SKIN OF SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS

Ana Paula de Sá Earp

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Coelho da Silva Carneiro

Prof. Dr. Absalom Lima Filgueira

Prof. Dr. Luiz Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Dermatologia).

**Background:** Recent studies have suggested that dermal CD34 positive-cells are diminished in the skin of patients with scleroderma and that these cells may have an important role in the pathogenesis of this disease

**Objectives:** Localize and quantify CD34 positive-cells in the skin of patients with systemic sclerosis and correlate the number of cells with duration of disease and fibrosis degree.

**Methods:** We analyzed the number of CD34 positive-cells by immunohistochemistry using anti-CD34 antibodies and paraffin-embedded skin sections from 26 patients with systemic sclerosis and from 10 healthy subjects. The counting of the cells was done in five random fields in the papillary dermis and five in the reticular dermis. The counting was done by two independent observers.

**Results:** We observed a marked reduction in the number of CD34 positive-cells in the skin of patients with systemic sclerosis. It occurred early, and could be noted in patients with one year or less of disease duration. The reduction of CD34 positive-cells preceded the appearance of intense fibrosis.

**Conclusion:** The CD34 positive-cells are localized mainly in the reticular dermis and are diminished in the skin of Systemic Sclerosis patients. This reduction occurs very early in the course of the disease. There is not a statistically significant correlation between the fibrosis degree and the quantity of CD34 positive-cells.

**Key words:** Scleroderma, Systemic – Antigens, CD34 – Extracellular Matrix.

Rio de Janeiro

August/2006

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 ESCLEROSE SISTÊMICA .....	3
2.1.1 <i>Epidemiologia</i> .....	3
2.1.2 <i>Classificação</i> .....	3
2.1.3 <i>Quadro clínico</i> .....	4
2.1.4 <i>Histopatologia</i> .....	7
2.1.5 <i>Diagnóstico Clínico</i> .....	9
2.1.6 <i>Diagnóstico Laboratorial</i> .....	11
2.1.7 <i>Patogênese</i> .....	11
2.2 MATRIZ EXTRACELULAR.....	23
2.2.1 <i>Colágeno</i> .....	24
2.2.2 <i>Metaloproteinases</i> .....	25
2.2.3 <i>Proteoglicanas/ Glicosaminoglicanas</i> .....	26
2.2.4 <i>Glicoproteínas</i> .....	26
2.2.5 <i>Metabolismo da matriz extracelular na Esclerodermia/Esclerose</i> <i>Sistêmica</i> .....	26
2.2.6 <i>Fibroblastos</i> .....	28

2.2.7	<i>Células derivadas da medula óssea e a pele</i> .....	30
2.2.8	<i>Fibrócitos</i> .....	33
2.3	CÉLULAS FUSIFORMES DÉRMICAS CD34 POSITIVAS .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>43</b>
4.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	43
4.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	43
4.3	SELEÇÃO DO MATERIAL E PREPARAÇÃO .....	43
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	44
4.5	IMUNOISTOQUÍMICA .....	48
4.6	QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS CORTES CORADOS .....	49
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

<b>Figura 1</b>	Imunoistoquímica. Pele sã. 20x.....	53
<b>Figura 2</b>	Imunoistoquímica. Esclerodermia. 20x.....	53
<b>Figura 3</b>	Imunoistoquímica. Pele sã. 40x.....	53
<b>Figura 4</b>	Imunoistoquímica. Esclerodermia. 40x.....	53
<b>Figura 5</b>	Imunoistoquímica. Controle negativo. 40x.....	53
<b>Figura 6</b>	Imunoistoquímica. Glândulas sudoríparas. 40x.....	54
<b>Figura 7</b>	Imunoistoquímica. Folículo piloso. 40x.....	54
<b>Figura 8</b>	Sistema-teste M42 sobre corte histológico. 40x.....	54

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

---

<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos pacientes segundo sexo, cor, idade, tempo de evolução da doença, grau de fibrose e forma clínica.....	44
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos controles segundo sexo, cor, idade e local da biópsia .....	45
<b>Tabela 3</b>	Imunofenótipo dos fibrócitos e das células dérmicas CD34 positivas.....	57
<b>Gráfico 1</b>	Número de células CD34+/mm <sup>2</sup> na derme papilar da pele normal e da pele dos pacientes com Esclerose Sistêmica.....	49
<b>Gráfico 2</b>	Número de células CD34+/mm <sup>2</sup> na derme reticular da pele normal e da pele dos pacientes com Esclerose Sistêmica.....	50
<b>Gráfico 3</b>	Número de células CD34+ na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica (derme papilar + reticular) de acordo com o tempo de evolução da doença.....	50
<b>Gráfico 4</b>	Número de células CD34+ na pele normal e na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica (derme papilar + reticular) de acordo com o tempo de evolução da doença.....	
<b>Gráfico 5</b>	Número de células CD34+ na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica (derme papilar + reticular) de acordo com o grau de fibrose observado.....	51
<b>Gráfico 6</b>	Número de células CD34+ na pele normal e na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica (derme papilar + reticular) de acordo com o grau de fibrose observado .....	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

CD	grupos de diferenciação
CDD	células dendríticas dérmicas
CTGF	fator de crescimento do tecido conjuntivo
ECA	enzima conversora da angiotensina
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ES	Esclerose Sistêmica
ET-1	endotelina-1
FGF	fator de crescimento fibroblástico
GAG	glicosaminoglicana
HLA	antígeno leucocitário humano
ICAM	molécula de adesão intercelular
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
INF- $\gamma$	interferon gama
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinase de matriz
NF $\kappa$ B	fator nuclear $\kappa$ B
PBS	tampão fosfato tamponado
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
RNA	ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucléico mensageiro
RNP	ribonucleoproteína
TGF- $\beta$	fator de crescimento transformante $\beta$
TIMP	inibidor tecidual da metaloproteinase
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral $\alpha$
UVA	ultravioleta A
VCAM	molécula de adesão da célula vascular
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -actina de músculo liso

# 1 INTRODUÇÃO

---

A Esclerodermia é uma doença do tecido conjuntivo, de causa desconhecida, caracterizada pela fibrose<sup>1</sup> dérmica. Variam amplamente sua magnitude e gravidade desde placas cutâneas endurecidas e isoladas, cuja importância é principalmente estética, até uma doença generalizada e potencialmente fatal. O coração, os pulmões, o trato gastro-intestinal e os rins são os órgãos mais freqüentemente envolvidos.

As principais alterações encontradas na pele decorrem da modificação do metabolismo da matriz extracelular, com aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos. Além do colágeno, têm sido relatadas alterações qualitativas e quantitativas em outros componentes da matriz extracelular como as glicoproteínas, as glicosaminoglicanas e as fibras elásticas.

Há pouco tempo quase todos os trabalhos dirigiam sua atenção para o estudo dos fibroblastos e miofibroblastos, que seriam os responsáveis pela produção excessiva de matriz extracelular. No entanto, estudos recentes identificaram na pele novos tipos celulares que também podem contribuir para a disfunção do metabolismo da matriz extracelular.

Estudos mostraram que células provenientes da medula óssea estão presentes na pele normal. Além disso, foi demonstrado que elas são capazes de migrar para

---

<sup>1</sup> Sabemos que fibrose é um termo inapropriado para descrever esta enfermidade. Esclerose também não é um termo correto, como comentaremos na seção "histopatologia". Por falta de termo mais adequado e seguindo a tendência dos artigos consultados optamos por usar o termo fibrose.

tecidos lesados e participar do processo de cicatrização sintetizando componentes da matriz extracelular.

Também foi descrita uma população de células na derme, de origem ainda desconhecida, que expressa o antígeno de células progenitoras humanas, CD34. Foi sugerido que elas podem desempenhar um papel central na regulação do metabolismo da matriz extracelular e conseqüentemente na patogênese das doenças fibróticas. Alguns estudos relataram diminuição destas células na pele de pacientes com Morféia.

O presente estudo tem por finalidade quantificar as células dérmicas CD34 positivas na pele dos pacientes com Esclerose Sistêmica e correlacionar a quantidade destas células com o tempo de evolução da doença e com o grau de fibrose. Apenas um estudo quantificou as células dérmicas CD34 positivas em pacientes com Esclerose Sistêmica e correlacionou seu número com o estágio histológico da doença. Nenhum estudo correlacionou a quantidade destas células com o tempo de evolução da doença.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 ESCLEROSE SISTÊMICA

#### 2.1.1 Epidemiologia

A Esclerose Sistêmica é uma doença rara. É quatro vezes mais freqüente nas mulheres do que nos homens e é mais freqüente entre os negros do que entre os brancos. A idade de aparecimento mais comum é entre a terceira e quinta décadas. A taxa de incidência anual na população adulta é de 21 por milhão, com uma prevalência de 276 por milhão. Os negros têm mais propensão a desenvolver a forma difusa da doença enquanto que entre os brancos a forma limitada é mais comumente encontrada. Não há diferenças entre os sexos com relação à extensão da doença (difusa x limitada) (MAYES 2003).

#### 2.1.2 Classificação

A Esclerose Sistêmica com acometimento cutâneo é classificada em limitada e difusa e a maioria dos pesquisadores tem utilizado a classificação proposta por LeRoy (letras A e B)(LEROY et al. 1988).

##### A. Esclerose Sistêmica Cutânea Limitada

- história de fenômeno de Raynaud há anos
- esclerose da pele limitada às mãos, pés, face e antebraços ou ausente
- incidência tardia de hipertensão pulmonar, neuralgia do trigêmeo, calcinose cutânea e telangiectasia
- presença de anticorpos anti-centrômero

- alças capilares dilatadas na dobra ungueal, usualmente sem desaparecimento dos capilares

#### B. Esclerose Sistêmica Cutânea Difusa

- início das alterações cutâneas menos de um ano após o início do fenômeno de Raynaud
- acometimento da pele acral e do tronco
- presença de atritos tendinosos
- incidência precoce e significativa de: doença pulmonar intersticial, comprometimento miocárdico, doença gastro-intestinal difusa, insuficiência renal oligúrica
- presença de anticorpos anti- topoisomerase (anti-Scl 70)
- ausência de anticorpos anti-centrômero
- dilatação e destruição dos capilares da dobra ungueal (detectada por capilaroscopia de campo alargado)

#### 2.1.3 Quadro clínico

##### **Esclerose Sistêmica limitada (CREST)**

Mais de 60% dos pacientes estão no grupo da Esclerose Sistêmica limitada, que inclui aqueles com a síndrome CREST. A síndrome CREST é assim denominada por apresentar calcinose cutânea, fenômeno de Raynaud, disfunção esofágica, esclerodactilia e telangiectasias. Esses pacientes têm início mais insidioso da doença, longa história de fenômeno de Raynaud, curso mais benigno e prognóstico

geralmente melhor. O acometimento sistêmico é geralmente limitado. Os anticorpos anti-centrômero são altamente específicos para esta síndrome e estão presentes entre 80 a 96% dos casos.

### **Esclerose Sistêmica difusa**

Os pacientes com Esclerose Sistêmica difusa têm início abrupto da doença e freqüentemente apresentam esclerose acral, fenômeno de Raynaud, artrite e rápida progressão da esclerose cutânea. O acometimento dos órgãos internos é precoce e manifesta-se por fibrose e anormalidades vasculares. Os anticorpos anti-centrômero são incomuns, mas anticorpos anti-topoisomerase-I (anti-Scl-70) estão presentes em aproximadamente 30 % dos pacientes. Os órgãos mais freqüentemente acometidos são o coração, os pulmões, o trato gastro-intestinal e os rins.

Existem 3 fases de acometimento cutâneo na Esclerose Sistêmica:

- edematosa
- endurativa
- atrófica

Na primeira fase ocorre edema indolor das mãos, da face e eventualmente dos antebraços, pernas e pés. Esta fase pode durar semanas ou meses e o endurecimento da pele pode ser pouco evidente. As manifestações cutâneas podem ser precedidas ou acompanhadas de poliartrite e fenômeno de Raynaud.

Na segunda fase o endurecimento da pele fica mais evidente. A pele se torna lisa, firme e aderida aos tecidos subjacentes. A fácies é característica exibindo a pele

esticada, com perda das linhas de expressão e da mímica facial, nariz afilado e lábios finos. Há ainda dificuldade para abrir a boca. A pele pode permanecer neste estágio por muitos anos, passar a uma fase de regressão, que geralmente se faz de forma centrípeta, ou evoluir para a fase atrófica.

Na pele podemos encontrar, além das alterações descritas acima, hiperpigmentação difusa, poiquilodermia, calcinose cutânea e úlceras nas polpas digitais.

O acometimento sistêmico é caracterizado por fibrose, anormalidades vasculares e perda progressiva da função dos órgãos acometidos (rins, pulmões, coração e trato orgãos do gastro-intestinal).

O esôfago está envolvido em 90% dos casos. Há atonia da musculatura lisa dos dois terços inferiores do esôfago, levando a disfagia e esofagite de refluxo. A atonia do intestino delgado pode levar à constipação, má absorção e diarreia.

No pulmão a fibrose intersticial progressiva não específica é a alteração mais encontrada, podendo levar a hipertensão pulmonar. A pleura pode ser afetada por uma pleurite fibrosa crônica.

O miocárdio, atingido pela fibrose, pode apresentar problemas de condução elétrica.

Pericardite também pode ocorrer.

A doença renal era no passado, a causa mais freqüente de morte. No entanto após o advento, com grande sucesso, dos inibidores da ECA no tratamento da crise renal esclerodérmica isso já não traduz a realidade (DENTON et al. 2004).

As manifestações esqueléticas são representadas inicialmente por poliartrite, que pode ser o primeiro sintoma da Esclerose Sistêmica. Posteriormente, pela limitação de movimento imposta pela rigidez da pele podemos ter anquilose das articulações e contraturas permanentes. As articulações das mãos são as mais freqüentemente envolvidas e pode haver reabsorção das falanges.

No músculo podemos encontrar fibrose e depósitos de cálcio.

#### **2.1.4 Histopatologia**

Numa fase precoce observam-se infiltrados inflamatórios perivascularares e intersticiais moderados constituídos predominantemente de linfócitos. Esse infiltrado também pode atingir os ductos das glândulas écrinas e o tecido adiposo. As fibras colágenas estão edematosas e espessadas.

Num estágio posterior, esses infiltrados estão reduzidos ou desaparecem completamente. Os vasos ficam escassos com paredes espessadas e hialinizadas e estreitamento da luz, levando a problemas circulatórios.

As alterações vasculares na Esclerose Sistêmica afetam principalmente a microcirculação e as arteríolas, com necrose capilar e proliferação da íntima das arteríolas resultando em oclusão dos vasos sanguíneos, diminuição da perfusão do órgão e um estado de isquemia crônica progressiva (KAHALEH 2004). Esse padrão de acometimento vascular parece se repetir em outros órgãos acometidos pela doença, como os pulmões e os rins (TROSTLE et al. 1988, AL-SABBAGH et al. 1989).

Os feixes colágenos estão espessados e densamente compactados. Apenas alguns poucos fibroblastos são vistos, tanto na derme reticular quanto nos septos que se estendem até o subcutâneo. As glândulas écrinas estão atróficas devido ao encarceramento pela fibrose circundante. Os folículos pilosos e as glândulas sebáceas estão ausentes (ELDER et al. 2001).

A Esclerodermia/ Esclerose Sistêmica não é uma verdadeira dermatite, paniculite ou fasciite fibrosante porque não está associada em nenhum estágio da doença com

um número aumentado de fibroblastos. Além disto as dermatites fibrosantes exibem alterações nos feixes colágenos diferentes das encontradas na Esclerodermia, isto é, feixes fibrilares e paralelos entre si nas cicatrizes e feixes grosseiros e dispostos ao acaso no quelóide e no dermatofibroma. As alterações do colágeno na Esclerodermia também não preenchem os critérios para esclerose. Na esclerose, feixes colágenos separados não são mais identificados (“homogeneização” do colágeno), ao contrário da Esclerodermia quando o oposto é verdadeiro; os feixes colágenos estão espessados mas sua individualidade está preservada (ACKERMAN 1997).

### **2.1.5 Diagnóstico Clínico**

O principal critério para o diagnóstico da ES é o achado de esclerose cutânea proximal às articulações metacarpofalangianas. A esclerodactilia (esclerose distal às articulações metacarpofalangianas), quando não acompanhada de outros achados, não é diagnóstica de ES (LEROY 1997).

Além das lesões cutâneas temos a nos auxiliar a história positiva de fenômeno de Raynaud (presente em 90% dos pacientes) e queixas relacionadas aos outros

órgãos acometidos. Palpitações, dispnéia, tosse, disfagia, epigastralgia, diarreia ou constipação, hipertensão e poliartralgia podem estar presentes na história e os pacientes devem ser questionados ao seu respeito. O doente deve ser examinado à procura de sinais de acometimento de órgãos internos com ênfase naqueles mais freqüentemente envolvidos.

Em 1980, o Colégio Americano de Reumatologia definiu os critérios para o diagnóstico de Esclerose Sistêmica (MASI et al. 1980).

#### Critérios Preliminares para o Diagnóstico de Esclerose Sistêmica

##### Critério maior

- (1) Esclerodermia proximal

##### Critérios menores

- (1) esclerodactilia
- (2) úlceras digitais puntiformes
- (3) fibrose pulmonar bibasal

Fazem o diagnóstico:

- 1 critério maior OU
- 2 ou 3 critérios menores

No entanto, com o avanço da tecnologia médica e melhoria dos recursos diagnósticos conseguimos identificar a doença em muitos pacientes que não preenchem os critérios propostos em 1980. Assim, muitos autores têm ressaltado a

necessidade de se modificar esses critérios, levando em conta os recursos disponíveis atualmente como a capilaroscopia e os auto-anticorpos (HAUSTEIN 2002; LEROY et al. 2001).

### **2.1.6 Diagnóstico Laboratorial**

O diagnóstico laboratorial da Esclerose Sistêmica é feito através do exame histopatológico, de testes sorológicos e da pesquisa de comprometimento visceral. A biópsia deve, preferencialmente, ser realizada em área da pele que tenha características clínicas de atividade.

Na Esclerose Sistêmica, há uma forte correlação entre os perfis de anticorpos e o fenótipo da doença, tornando os testes sorológicos úteis no diagnóstico e prognóstico.

A pesquisa de doença visceral deve ser realizada apenas nas formas sistêmicas e inclui capilaroscopia, prova de função pulmonar, eletro e ecocardiograma, dosagem de creatinina, manometria do esôfago entre outros.

### **2.1.7 Patogênese**

Embora os mecanismos exatos envolvidos na patogênese da Esclerose Sistêmica não sejam bem compreendidos, existem três processos responsáveis pelas manifestações clínicas e patológicas da doença:

- descontrolo do metabolismo da matriz extracelular, com deposição maciça de tecido conjuntivo, representado principalmente por colágeno, na pele e órgãos internos
- lesão vascular
- alterações na imunidade humoral e celular

No momento, não está claro qual destes três componentes é o mais importante ou como eles se relacionam entre si para causar o processo fibrótico progressivo. É provável que aconteçam simultaneamente, e que a isquemia e a fibrose sejam responsáveis pelo desenvolvimento das insuficiências orgânicas. Há evidências de que a lesão vascular e a deposição de colágeno devam ser mediadas por citocinas liberadas por linfócitos e monócitos.

O enorme progresso na compreensão de vários dos mecanismos básicos, ocorrido nos últimos anos, lançou uma luz na complexa patogênese desta enfermidade.

#### **2.1.7.1 Alterações vasculares**

O envolvimento do sistema vascular na Esclerodermia é uma das manifestações iniciais da doença e parece ser um evento crucial na sua patogênese.

A hipóxia tecidual é, em tecidos sadios, um estímulo para a formação de novos vasos sanguíneos. No entanto, na Esclerodermia há angiogênese insatisfatória em resposta à diminuição do fluxo sanguíneo e a baixas pressões parciais de oxigênio (DISTLER et al. 2002).

A alteração dos processos angiogênicos contribui para uma redução crônica do aporte de oxigênio aos tecidos, resultando em manifestações isquêmicas como as úlceras das polpas digitais.

A origem deste distúrbio na angiogênese ainda não é perfeitamente conhecida, porém acredita-se que seja devido à síntese deficiente de fatores angiogênicos ou inibição inapropriada de fatores angiostáticos (DISTLER et al. 2002).

A rede capilar está diminuída, há dano a células endoteliais e duplicação da lâmina basal dos vasos. As pequenas artérias revelam espessamento da média, degeneração fibrinóide ou hialina, espessamento da íntima e deposição de colágeno

na subíntima, levando ao estreitamento da luz e necrose isquêmica (SAPADIN et al. 2001). Os pequenos vasos nos tecidos afetados mostram um infiltrado inflamatório perivascular com células T ativadas. Foi sugerido que citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), secretados por esses linfócitos T ativados causam ativação e injúria às células endoteliais (DERK et al. 2003).

O TGF- $\beta$  regula positivamente o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) que, por sua vez, induz a uma produção aumentada de componentes da matriz extracelular (MEC) assim como uma regulação positiva de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). O PDGF é um potente mitógeno de células endoteliais levando a uma proliferação endotelial aumentada (DERK et al 2003). Sabemos que no acometimento vascular do pulmão há, numa fase precoce, formação excessiva de capilares alveolares acompanhado de um aumento do número de células endoteliais microvasculares. A anormalidade vascular também envolve o desenvolvimento de microvasos, que são irregulares na forma e no tamanho. No entanto, a população de células endoteliais capilares diminui com a progressão da fibrose (BEON et al. 2004). Talvez o PDGF estimule a angiogênese na fase inicial da doença, mas não consiga mantê-la devido a anormalidades nos níveis de outros fatores angiogênicos.

Foi demonstrado que na Esclerose Sistêmica (ES) há uma regulação negativa do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que resulta em diminuição da neovascularização (DERK et al 2003).

A quimioatração dos fibroblastos para a parede do vaso e a transdiferenciação dos fibroblastos residentes na parede vascular em miofibroblastos ocorre como resultado

das citocinas secretadas localmente causando um aumento da deposição e síntese de colágeno (DERK et al 2003).

A injúria endotelial leva a exposição do subendotélio às plaquetas circulantes, que se aderem a ele, e iniciam deposição de fibrina e formação de trombo intravascular. As lesões fibroproliferativas e a trombose intravascular resultam inevitavelmente em um estado de hipóxia local nos tecidos afetados. Estudos recentes demonstraram que a hipóxia local pode causar fibrose tecidual pela ativação de genes de colágeno e TGF- $\beta$  (DERK et al 2003).

A vasodilatação também está prejudicada nos pacientes com ES. Ela é controlada por fatores endoteliais e neurológicos. As células endoteliais regulam o tônus vascular secretando substâncias vasoativas como o óxido nítrico e o peptídeo relacionado à calcitonina, que são vasodilatadores, assim como a endotelina-1, que é um vasoconstritor potente. Na ES parece haver uma deficiência relativa de vasodilatadores e um aumento relativo de vasoconstritores. Isso causa mais hipóxia e injúria endotelial, resultando na produção e liberação de mais citocinas pelas células inflamatórias, mantendo, assim, o círculo vicioso de injúria endotelial e fibrose (DERK et al. 2003).

Um estudo demonstrou níveis aumentados de endotelina-1 e de seus receptores na microvasculatura e no parênquima dos tecidos afetados (KALALEH 1991).

Outro estudo que investigou o papel das calicreínas, poderosas efetadoras da resposta angiogênica, na ES, concluiu que as células endoteliais de pacientes com ES demonstravam expressão diminuída das calicreínas 9, 11 e 12, se comparadas às células endoteliais de controles saudáveis. Anticorpos contra as calicreínas 9, 11 e 12 aplicados às células endoteliais normais revelaram que enquanto as calicreínas 9, 11 e 12 induzem o crescimento celular, apenas a calicreína 12 regula a invasão e

morfogênese capilar. O bloqueio da calcitreína 12 com anticorpo resultou numa aquisição, pelas células normais, de um padrão semelhante à ES, na angiogênese *in vitro*. (GIUSTI et al. 2005)

Os efeitos da disfunção vascular nos pacientes com ES são mais dramáticos quando eles envolvem as arteríolas renais e pulmonares, causando a crise renal e a hipertensão pulmonar, que são as maiores causas da morbidade e mortalidade da ES (DERK et al. 2003).

### **2.1.7.2 Mecanismos Imunes**

#### **Imunidade Celular**

Infiltrados de células inflamatórias são encontrados na pele de pacientes com Esclerodermia. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são as células predominantes e mostram marcadores de ativação. Além deles encontramos também monócitos, plasmócitos e mastócitos nesses infiltrados (SAPADIN et al. 2001).

Essas células são capazes de liberar citocinas que agem estimulando a migração, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno e glicosaminoglicanas.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (células T auxiliares ou *T helper*) consistem de dois subgrupos, Th1 e Th2, caracterizados por padrões distintos de secreção de citocinas. Enquanto as células Th1 secretam IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , promovendo a imunidade celular, as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, estimulando a imunidade humoral (HASEGAWA et al. 2005).

A IL-4, a IL-6 e a IL-13 estimulam a síntese de colágeno pelos fibroblastos. Por outro lado, as citocinas Th1, como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , suprimem a produção de colágeno *in vitro*. Assim, um desvio relativo a favor das citocinas Th2, se comparadas com as

citocinas Th1, pode induzir fibrose tecidual e produção de anticorpos (HASEGAWA et al. 2005).

Várias citocinas estão aumentadas no soro de pacientes com ES como as IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-8. Além disso, temos aumento de uma série de fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  e o PDGF e uma expressão aumentada nas células endoteliais de algumas moléculas de adesão como a E-selectina, o ICAM-1 e o VCAM-1 (SAPADIN et al. 2001).

Todos esses fatores parecem contribuir para um descontrole da balança do metabolismo da matriz extracelular. Os fatores pró-fibróticos predominam, com prejuízo dos fatores inibidores da síntese e daqueles que estimulam a degradação da matriz.

#### TGF- $\beta$

O TGF- $\beta$  é um homodímero sintetizado por uma grande variedade de células (monócitos-macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais e plaquetas). Existem três isoformas (TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TGF- $\beta$  3) que se ligam ao mesmo receptor, mas que diferem na sua expressão tissular. A via de sinalização do TGF- $\beta$  depende de dois receptores transmembrana (TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII) e de fatores de sinalização chamados Smad. O Smad2 e o Smad3 estão implicados na regulação positiva, com ativação da transcrição de genes fibrogênicos, enquanto que o Smad6 e o Smad7 têm um papel de regulação negativa (GRANEL et al. 2005).

A sinalização do TGF- $\beta$  está alterada nos fibroblastos esclerodérmicos com expressão diminuída do Smad7 e expressão aumentada do Smad3 (TAMBY et al. 2003).

O TGF- $\beta$  é um potente ativador de fibroblastos, induz a sua proliferação, quimiotaxia e diferenciação em miofibroblastos. O TGF- $\beta$  protege ainda os miofibroblastos do

processo de apoptose, aumenta a síntese da MEC, diminui as metaloproteinases (MMPs) e aumenta os inibidores tissulares das metaloproteinases (TIMPs). Enfim, induz a síntese de PDGF e de fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), dois fatores de crescimento também implicados no processo de fibrose (GRANEL et al. 2005).

O papel do TGF- $\beta$  na patogênese da Esclerodermia já foi alvo de muitos estudos. *In vitro*, o TGF- $\beta$  estimula a síntese de componentes da matriz extracelular, incluindo colágenos tipos I e III, glicosaminoglicanas e fibronectina (VARGA et al. 1987). Além disso, promove fibrose, pois aumenta a síntese de inibidores das metaloproteinases da matriz (TIMPs). Esses inibidores, particularmente a TIMP-1, estão elevados no soro de pacientes com Esclerodermia (KIKUCHI et al. 1995; KIKUCHI et al. 1997).

O TGF- $\beta$  pode também regular a produção de colágeno indiretamente, por seus efeitos em outras citocinas e fatores de crescimento. O PDGF estimula a proliferação de fibroblastos e aumenta a síntese de colágeno. O TGF- $\beta$  produz um aumento de receptores de PDGF- $\alpha$  e seu RNA mensageiro nos fibroblastos esclerodérmicos (YAMAKAGE et al. 1992). O TGF- $\beta$  também induz a produção pelas células endoteliais de endotelina-1, que estimula a síntese de colágeno pelos fibroblastos (KAHALEH 1991).

A produção de TGF- $\beta$  mostrou ser similar nos fibroblastos de pacientes com Esclerose Sistêmica e naqueles de pessoas saudáveis, mas os níveis dos receptores de TGF- $\beta$  demonstraram estar aumentados nos fibroblastos esclerodérmicos em alguns estudos. Foi sugerido que o nível elevado de receptores de TGF- $\beta$  é o defeito primário que leva ao aumento da sinalização autócrina do TGF- $\beta$  (KAWAKAMI et al. 1998; NEEDLEMAN et al. 1990).

Ihn et al. demonstraram que o bloqueio da sinalização endógena do TGF- $\beta$  via anticorpos neutralizantes preveniu a regulação positiva da síntese de colágeno nos fibroblastos esclerodérmicos (IHN et al. 2001).

### **Imunidade Humoral**

Os linfócitos B desempenham um papel fundamental na auto-imunidade através de várias funções, além da produção de auto-anticorpos, como apresentação de antígeno e produção de citocinas (FUJIMOTO et al. 2005).

A depleção de células B com anticorpo quimérico humano anti-CD20 foi um tratamento efetivo em várias doenças auto-imunes como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide (HASEGAWA et al. 2005).

As respostas da imunidade humoral e a produção de auto-anticorpos são reguladas parcialmente pelos receptores de antígeno das células B. A auto-imunidade e as respostas imunes são adicionalmente reguladas ou finamente ajustadas por moléculas de transdução de sinal que amplificam ou inibem a sinalização do receptor de antígeno durante as respostas a antígenos próprios e estranhos. Essas moléculas reguladoras incluem um grupo de receptores de superfície celular, funcionalmente inter-relacionados, como o CD19, CD21 e CD22 (SATO et al. 2000).

Camundongos transgênicos que superexpressam CD19 perdem a tolerância e geram auto-anticorpos espontaneamente (HASEGAWA et al. 2005).

Sato et al. demonstraram que a expressão de CD19 está aumentada nos linfócitos B de pacientes com Esclerose Sistêmica. Estes autores sugerem que pequenas alterações na expressão ou função das moléculas reguladoras como o CD19 pode levar à perda da tolerância e à auto-imunidade (SATO et al. 2000).

Pacientes com Esclerose Sistêmica têm alterações na homeostase de células B caracterizada por expansão de células B *naive* e diminuição de células B de

memória. Embora as células B de memória estejam diminuídas elas são cronicamente ativadas, possivelmente por causa da superexpressão de CD19 (FUJIMOTO et al. 2005).

Um modelo animal de Esclerose Sistêmica (camundongos TSK/+) mostrou aumento na sinalização de CD19 e ativação crônica de células B, além de níveis elevados de auto-anticorpos, como a anti-topoisomerase-I. Neste modelo, a perda de CD19 resultou na inibição da hiper-reatividade crônica das células B e eliminação da produção de auto-anticorpos, o que se associou com melhora da fibrose cutânea e diminuição paralela de produção de IL-6 pelas células B. Assim, o aumento na produção de citocinas pelas células B pode contribuir para a indução da esclerose cutânea. As células B também podem influenciar a fibrose tecidual pela regulação da ativação de células T e pela produção de citocinas através de suas habilidades co-estimulatórias e de apresentação de antígenos (HASEGAWA et al. 2005).

A superexpressão de CD19 parece ser específica da Esclerose Sistêmica já que não é detectada em outras doenças auto-imunes como o lupus eritematoso sistêmico, dermatomiosite ou doenças bolhosas auto-imunes<sup>2</sup> (HASEGAWA et al. 2005).

Mais estudos serão necessários para esclarecer o mecanismo molecular preciso que liga as células B e a fibrose.

### **Auto-anticorpos**

A presença de anticorpos específicos é uma das mais comuns manifestações da ES, e mais de 90% dos pacientes têm anticorpos antinucleares no seu soro. Numerosos anticorpos foram descritos em pacientes com ES.

---

<sup>2</sup> Observações de SATO S (não publicadas).

Anticorpos anti-Scl-70 ou anti-topoisomerase-I estão, quase que exclusivamente, presentes no soro de pacientes com a forma difusa da doença e 30 a 40% destes pacientes possuem este anticorpo (DERK et al. 2003).

Anticorpos anti-centrômero estão usualmente presentes em pacientes com a forma limitada da doença e são vistos em 80-96% deles (DERK et al. 2003). Ao contrário dos anticorpos anti-Scl-70, os anticorpos anti-centrômero são achados em aproximadamente 10% dos pacientes com a forma difusa (DERK et al. 2003).

Outros anticorpos menos vistos em pacientes com ES são os anticorpos anti-RNA polimerases I e III, anti-fibrilina e anti-PM-Scl, este último normalmente associado com a síndrome de superposição Esclerose Sistêmica / Polimiosite (DERK et al. 2003).

Os auto-anticorpos na ES nos dão informações prognósticas e são úteis na definição dos subtipos da doença. Até recentemente seu papel na patogênese da doença permanecia obscuro, no entanto, novos estudos têm sugerido papel patogênico dos auto-anticorpos na ES (CHIZZOLINI et al. 2002; HENAULT et al. 2006; MARKS et al. 1988; NISHIJIMA et al. 2004; RONDA et al. 2002; SATO et al. 2003; SGONC et al. 2000; ZHOU et al. 2005).

Anticorpos anti-endoteliais, que estão presentes em 25 a 85% dos pacientes (RENAUDINEAU et al. 1999), demonstraram desencadear citotoxicidade celular dependente de anticorpos (MARKS et al. 1988, SGONC et al. 2000).

Anticorpos anti-fibroblastos, presentes em 26 a 58% dos pacientes (CHIZZOLINI et al. 2002, HENAULT et al. 2004), mostraram-se capazes de induzir um fenótipo pró-adesivo e pró-inflamatório nos fibroblastos após sua ligação (CHIZZOLINI et al. 2002, RONDA et al. 2002).

Anticorpos anti-topoisomerase-I ligam-se a topoisomerase-I na superfície dos fibroblastos, estimulando a adesão e a ativação de monócitos. Isto poderia levar à amplificação da resposta imune devido à citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos monócitos ativados e à fibrose pela secreção local de citocinas pró-fibróticas pelos fibroblastos ativados. Assim a presença da anti-topoisomerase I estaria diretamente associada com o aumento das respostas imunes e com a fibrose (HENAULT et al. 2006).

Recentemente foi descoberto um novo anticorpo, específico da Esclerose Sistêmica, contra porções da fibrilina-1, a componente principal das microfibrilas da MEC e reguladora da sinalização do TGF- $\beta$ 1. Comparados aos fibroblastos dérmicos crescidos em meio de cultura normal ou com imunoglobulina G (IgG) humana normal, os fibroblastos crescidos em meio de cultura com anti-fibrilina-1 mostraram aumento da expressão de colágeno e de outros componentes da MEC, que estão caracteristicamente aumentados nos fibroblastos esclerodérmicos. A neutralização do TGF- $\beta$ 1 com anticorpos anti-TGF- $\beta$ 1 diminuiu significativamente a ativação dos fibroblastos pelos anticorpos anti-fibrilina-1. Esses dados sugerem que os anticorpos anti-fibrilina 1 podem induzir a ativação de fibroblastos dérmicos normais resultando em um fenótipo pró-fibrótico similar àquele da Esclerose Sistêmica (ZHOU et al. 2005).

Estudos encontraram níveis elevados de anticorpos anti-metaloproteinase-1(anti-MMP-1) e anti-metaloproteinase-3 (anti-MMP-3) no soro de pacientes com Esclerose Sistêmica. Os níveis de ambos eram mais altos nos pacientes com doença difusa que naqueles com doença limitada. Além disso, estes níveis correlacionaram-se com a extensão da fibrose cutânea, pulmonar e renal. Os autores sugerem que os anticorpos anti-MMP-1 e anti-MMP-3 contribuem para o desenvolvimento da fibrose

inibindo a atividade da MMP-1 e da MMP-3, respectivamente, e reduzindo o remodelamento da MEC (NISHIJIMA et al. 2004; SATO et al. 2003).

### **Microquimerismo**

O microquimerismo foi definido como a presença de um pequeno número de células circulantes transferidas de um indivíduo para outro. A transferência de células microquiméricas acontece naturalmente durante a gravidez, e ocorre bidirecionalmente entre a mãe e o feto, e entre os fetos em gravidezes múltiplas. Além disso, também pode ocorrer durante transfusões sanguíneas, transplantes de medula e de órgãos. Essas células podem permanecer na circulação sanguínea por muitos anos.

Recentemente, células microquiméricas foram incriminadas na patogênese de doenças auto-imunes, particularmente da Esclerose Sistêmica. Muita controvérsia ainda existe em torno do papel destas células na patogênese de certas doenças, e a presença destas células nos tecidos pode ser consequência ao invés de causa destas doenças (ARTLETT 2003).

Alguns estudos demonstraram um aumento de células microquiméricas no sangue periférico e nos tecidos dos pacientes com Esclerose Sistêmica e, mais recentemente, demonstrou-se que essas células são especificamente ativadas e capazes de reconhecer o antígeno leucocitário humano (HLA) dos pacientes (ARTLETT 2003).

#### **2.1.7.3 Fatores genéticos**

Vários estudos sugerem uma base genética para a suscetibilidade à ES. A ES ocorre mais frequentemente em famílias com ES que na população geral. Uma história familiar positiva de ES confere um alto risco relativo, embora o risco absoluto

para cada membro da família permaneça baixo (<1%) (ARNETT et al. 2001). A concordância para o fenótipo clínico é semelhante entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos (~ 5%), mas a concordância para anticorpos antinucleares é significativamente maior nos gêmeos monozigóticos (95%) se comparados com os gêmeos dizigóticos (60%) (FEGHALI-BOSTWICK et al. 2003).

Zhou et al. não demonstraram nos fibroblastos de pacientes com ES, de pele acometida ou não acometida, diferenças quanto à expressão de genes. Os fibroblastos dos pacientes tinham perfil de expressão de genes significativamente diferente daqueles de seus gêmeos dizigóticos e dos controles normais. Gêmeos monozigóticos não afetados, no entanto, não eram significativamente diferentes dos pacientes com ES. Quando fibroblastos normais foram incubados com soro de paciente com ES ou com soro de seu irmão monozigótico não afetado eles desenvolveram expressão aumentada de COL1A2 (gene da cadeia  $\alpha 2$  do colágeno I), SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) e CTFG, tipicamente visto em fibroblastos esclerodérmicos (ZHOU et al. 2005).

## 2.2 MATRIZ EXTRACELULAR

Os espaços extracelulares nos tecidos são preenchidos por uma matriz extracelular (MEC) organizada que é composta de proteoglicanos (como a decorina e a fibromodulina), proteínas fibrosas (como o colágeno, a elastina e a fibrilina), glicoproteínas (como a fibronectina e a laminina), e diversos tipos de metaloproteinases da matriz.

A MEC desempenha papéis relevantes na sinalização e atividades celulares. A manutenção da sua estrutura e função ocorre através de um processo de remodelamento, com fases de degradação e síntese dos seus componentes (GHOSH 2002).

### **2.2.1 Colágeno**

O colágeno tipo I é o colágeno mais abundante na pele, representando 80 a 90% do colágeno da derme. É uma tripla hélice formada por duas cadeias  $\alpha 1$  e uma cadeia  $\alpha 2$ . Eles são codificados por dois genes distintos: o da cadeia  $\alpha 1$  é denominado COL1A1, e o da cadeia  $\alpha 2$ , COL1A2 (GHOSH 2002). As cadeias polipeptídicas pró-COL1A1 e COL1A2 são sintetizadas por fibroblastos, osteoblastos e odontoblastos e entram no retículo endoplasmático. Neste local, resíduos específicos de prolina e lisina são hidroxilados para formar a hidroxiprolina e a hidroxilisina, respectivamente. Estes, por sua vez, ajudam as cadeias pró- $\alpha$  a combinar-se com outras cadeias por pontes de hidrogênio e a formarem a estrutura de tripla hélice do pró-colágeno. Os pró-colágenos são secretados pelos fibroblastos através do aparelho de Golgi no espaço extracelular onde os pró-peptídeos C-terminal e N-terminal são clivados por proteases específicas (GHOSH 2002). As moléculas de colágeno processado maduro agregam-se para formar fibras colágenas maiores e ajudar a formar a MEC, junto com seus outros componentes. Assim sendo, a produção e deposição de colágeno tipo I necessita de regulação em diversos níveis. Anormalidades em qualquer nível podem levar a diminuição, aumento ou síntese defeituosa e acúmulo de colágeno na MEC, o que, por sua vez, causa diferentes doenças como a osteogênese imperfecta, escorbuto, Esclerodermia, quelóides, fibrose pulmonar, fibrose hepática, etc. (GHOSH 2002).

A síntese de ambas as cadeias é regulável por diversas citocinas ao nível da transcrição. Síntese e deposição excessiva de colágeno na região da derme causam espessamento e endurecimento da pele, uma manifestação clínica da Esclerodermia (GHOSH 2002).

### **2.2.2 Metaloproteinases**

As metaloproteinases da matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas, produzidas pelos fibroblastos, cuja função é digerir os componentes da MEC. Fibroblastos também produzem inibidores específicos das MMPs, conhecidos como inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz (TIMPs). As TIMPs agem localmente bloqueando MMPs ativas e prevenindo a digestão da MEC. Acredita-se que o equilíbrio entre os níveis de MMPs e TIMPs governa a homeostase do tecido conjuntivo (YOUNG-MIN et al. 2001).

### **2.2.3 Proteoglicanas/ Glicosaminoglicanas**

As proteoglicanas contêm uma proteína central onde uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas (GAGs) se ligam. As glicosaminoglicanas são glicídios formados pela polimerização de uma unidade constituída por um ácido urônico e uma hexosamina. O ácido urônico é quase sempre o glicurônico e as hexosaminas são a glicosamina ou a galactosamina. As GAGs podem ser sulfatadas ou não sulfatadas. Dentre as GAGs não sulfatadas a mais encontrada no tecido conjuntivo é o ácido hialurônico. Entre as sulfatadas temos o dermatan sulfato, o condroitin sulfato e o heparan sulfato (JUNQUEIRA 1982).

### **2.2.4 Glicoproteínas**

As glicoproteínas têm como sua função principal ligar as proteínas da MEC às células e também estão envolvidas em diversos processos morfogênicos e de remodelagem tecidual. Encontram-se intimamente relacionados a receptores celulares que são fundamentais na interação MEC - célula. A fibronectina é uma glicoproteína com propriedade de se ligar ao colágeno e à fibrina e que parece ter um papel importante na ligação entre as células e a MEC (SALGADO 2000).

### **2.2.5 Metabolismo da matriz extracelular na Esclerodermia/Esclerose Sistêmica**

Os fibroblastos da pele de doentes com Esclerodermia sintetizam quantidades aumentadas de proteínas da matriz extracelular, principalmente colágeno (KISSIN et al. 2003).

Estudos demonstraram aumento na transcrição do gene para a cadeia  $\alpha 1$  do colágeno I em fibroblastos dérmicos de pacientes com Esclerodermia e predomínio deste tipo de colágeno na derme reticular de pacientes em estágios avançados da doença (VUORIO et al. 1985).

Em outro estudo, fibroblastos de pacientes com ES mostraram, *in vitro*, níveis basais de RNA mensageiro (RNAm) para cadeia  $\alpha 2$  do colágeno I três vezes maiores do que fibroblastos de pacientes normais (HIRONOBU et al. 2000).

Herrmann et al. compararam os níveis de RNAm de colágenos I, III, fibronectina e colagenase (MMP-1) de biópsias de pele de nove pacientes com Esclerose Sistêmica com doze controles. Foi encontrada uma elevação dos níveis de RNAm de colágeno I de mais de três vezes na pele com ES quando comparada aos controles. Não houve diferença nos níveis de RNAm de colágeno III, colagenase e fibronectina nas biópsias de pacientes e controles (HERRMANN et al. 1991).

Em um estudo utilizando imunofluorescência indireta e anticorpos específicos contra colágenos intersticiais e pró-colágenos, Fleischmajer et al. encontraram uma marcação bastante aumentada para pró-colágeno tipo I e fibronectina na derme inferior e subcutâneo dos pacientes com Esclerodermia (FLEISCHMAJER et al. 1980).

Fibroblastos esclerodérmicos cultivados apresentam níveis diminuídos de colagenase (ou MMP-1) (KURODA et al. 1997; TAKEDA et al. 1994).

A atividade da gelatinase A (ou MMP-2) está aumentada nos fibroblastos esclerodérmicos, embora não tenha sido demonstrado aumento do seu RNAm (FAKHOURY et al. 2002). A gelatinase A é uma enzima que degrada especificamente a membrana basal. Segundo Fakhoury et al. a atividade aumentada da gelatinase A pode estar relacionada à fisiopatologia da Esclerose Sistêmica,

iniciando dano microvascular e extravasamento de substâncias capazes de produzir mais injúria às células endoteliais ou ativação de fibroblastos (FAKHOURY et al. 2002).

A produção de estromelina (ou MMP-3) está diminuída nos fibroblastos esclerodérmicos (BOU-GHARIOS et al. 1994; KIRK et al. 1995). Além disso, as TIMPs-1, TIMP-2 e TIMP-3 estão aumentadas (BOU-GHARIOS et al. 1994; MATTILA et al. 1998; YAZAWA et al. 2000).

Alguns estudos relatam alterações no conteúdo de GAGs na pele com Esclerodermia. Estudos revelaram que na derme destes pacientes há aumento de delta Di-4S, a principal unidade dissacarídea do dermatan sulfato, e diminuição do delta Di-HA, a principal unidade dissacarídea do ácido hialurônico (AKIMOTO et al. 1992; YOKOYAMA et al. 1997). Outro estudo relatou produção aumentada de decorina e de GAGs sulfatadas, incluindo o dermatan sulfato e o condroitin sulfato, pelos fibroblastos esclerodérmicos (KURODA et al. 1997).

### **2.2.6 Fibroblastos**

Os fibroblastos são células derivadas de células mesenquimais que sintetizam o principal colágeno fibrilar intersticial que dá estrutura aos órgãos e tecidos do corpo. São fundamentais para o reparo de feridas e para a manutenção da matriz de tecido conjuntivo (POSTLETHWAITE et al. 2004).

Estudos recentes definiram novos conceitos com respeito à função dos fibroblastos. Em primeiro lugar, fibroblastos, mesmo os originários de um único tecido, não constituem uma população homogênea, mas consistem de vários subtipos, assim como os linfócitos. Em segundo lugar, fibroblastos de diferentes regiões anatômicas apresentam fenótipos diferentes. Essa diversidade regional pode refletir as funções

especializadas do tecido de origem e podem ser a base da susceptibilidade localizada a manifestações de doenças. Em terceiro lugar, os fibroblastos podem ser ativados para exibir novas funções, importantes para controlar a síntese de MEC e para produzir citocinas e quimiocinas. Essa característica é análoga àquela das células do sistema imune, como os macrófagos e os linfócitos T e B, que podem ser ativados. Em quarto lugar, os fibroblastos podem regular as células hematopoéticas que infiltram um tecido que foi lesionado, especialmente por infecção (SMITH et al. 1997).

Os miofibroblastos são células da família dos fibroblastos que exibem um fenótipo híbrido entre fibroblastos e células musculares lisas. Eles são caracterizados pela expressão de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e secretam proteínas da MEC. Durante o processo de cicatrização os miofibroblastos estão transitoriamente presentes no tecido, onde eles parecem desempenhar um papel fundamental na contração das feridas e na restauração do tecido conjuntivo. No entanto, essas células persistem nas lesões fibróticas e acredita-se que sejam responsáveis pela produção excessiva de colágeno (GROTENDORST et al. 2005).

Até recentemente pouca atenção tinha sido dada à origem celular destes fibroblastos e miofibroblastos que povoam os tecidos fibróticos.

A visão que prevaleceu por décadas foi a de que os fibroblastos que povoam os tecidos normais são derivados do mesênquima remanescente de quando os órgãos são formados durante o desenvolvimento fetal. Durante a inflamação e a injúria tecidual, esses fibroblastos residentes proliferariam e regulariam positivamente a síntese da MEC, em resposta a citocinas e fatores de crescimento, resultando em fibrose e formação de cicatriz (POSTLETHWAITE et al. 2004).

Atualmente emergiram duas novas hipóteses a respeito da origem dos fibroblastos adultos. Uma hipótese argumenta que os fibroblastos teciduais derivam de uma subpopulação de leucócitos, denominados fibrócitos, que navegam pela circulação para povoar órgãos periféricos (ABE 2001; BUCALA 1994). Uma segunda hipótese propõe que os fibroblastos são formados por conversão local das células epiteliais num processo denominado transição epitelial-para-mesenquimal (IWANO et al. 2002). Trabalhos demonstram que fibroblastos podem se originar não só da proliferação de fibroblastos residentes, mas também de diferentes tipos celulares como fibrócitos circulantes, monócitos CD14+, pericitos, células epiteliais e células hepáticas estreladas (POSTLETHWAITE et al. 2004). Com relação aos miofibroblastos, considerava-se que eles desenvolviam-se a partir dos fibroblastos tissulares em resposta a estimulação com TGF- $\beta$  e outros fatores de crescimento e citocinas (SERINI et al. 1999). No entanto, novas evidências parecem sugerir que, na verdade, os miofibroblastos derivam de precursores derivados da medula óssea (BRITTAN et al. 2002). Foi sugerido que esses precursores seriam os fibrócitos circulantes (SCHMIDT et al. 2003).

### **2.2.7 Células derivadas da medula óssea e a pele**

O estroma da medula óssea tem células precursoras capazes de diferenciarem-se em células das linhagens hematopoética e mesenquimal. Células-tronco hematopoéticas podem reconstituir toda a população de células circulantes hematopoéticas. Células-tronco mesenquimais podem diferenciar-se para formar osteócitos, condrócitos, adipócitos e fibroblastos do estroma da medula óssea. Ambos os tipos de células-tronco retêm um alto grau de plasticidade e são capazes

de contribuir com células progenitoras regenerativas para tecidos hematopoéticos e não-hematopoéticos, incluindo a pele (FATHKE et al 2004).

A maioria das células hematopoéticas, com exceção das hemácias e seus progenitores imediatos, expressam o antígeno de superfície celular CD45. Além disso, um subgrupo de células hematopoéticas expressa CD34, um receptor de superfície expresso na superfície de células progenitoras hematopoéticas. Contrastando com isso, células-tronco mesenquimais não expressam CD34 ou CD45.

Fathke et al. usando um modelo animal (camundongos quiméricos resultantes da irradiação de camundongos normais e posterior transplante com a medula de camundongos transgênicos enriquecida com proteína verde fluorescente (*enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic mice*)) mostraram que, 10 semanas depois do transplante de medula, 14% das células da pele normal (derme + epiderme) (não submetida à injúria) eram derivadas da medula óssea (células EGFP+). Essas células foram vistas infiltrando a derme normal com algumas células exibindo prolongamentos dendríticos em direção à epiderme. A maior parte das poucas células vistas na epiderme estavam intimamente relacionadas com os folículos pilosos; raras células foram vistas em volta das glândulas sebáceas e sudoríparas. Após 8 meses, as células derivadas da medula representavam 11% de todas as células da pele. Este estudo mostra que há contribuição constante de células da medula óssea para a pele normal (FATHKE et al. 2004).

Para verificar a contribuição das células derivadas da medula óssea nos outros órgãos, foram realizadas necropsias nos camundongos quiméricos irradiados 8 a 12 meses após o transplante. Foram examinados a pele, o coração, os pulmões, o cérebro, o baço, o intestino delgado, a aorta e os rins. Todos os tecidos tinham

células derivadas da medula em diferentes quantidades, mas a pele normal tinha uma das maiores concentrações, indicando que ela é um alvo primário das células derivadas da medula óssea (FATHKE et al. 2004).

Examinando o papel destas células na cicatrização, Fathke et al. observaram células derivadas da medula óssea em toda a derme em cicatrização durante a fase inflamatória precoce, e também posteriormente, na fase de remodelamento. Estas células eram fusiformes e similares aos fibroblastos na fase de remodelamento (FATHKE et al. 2004).

Muitos estudos de cicatrização cutânea usam a expressão de marcadores de superfície celular para identificar as células derivadas da medula óssea. No entanto, devido à plasticidade das células derivadas da medula óssea, a utilização destes marcadores pode subestimar a contribuição da medula óssea para a cicatrização cutânea (FATHKE et al 2004). Para verificar se o CD45, frequentemente usado para rastrear células derivadas da medula, é um bom marcador para estas células, na pele normal e em cicatrização, Fathke et al. compararam a percentagem de células co-expressando EGFP e CD45. Na pele normal, 8 meses após o transplante, há uma população significativa de células EGFP+ que não co-expressam CD45. Na fase precoce de cicatrização quase todas as células EGFP+ expressavam CD45, aos 28 dias aproximadamente 5% das células são CD45- e aos 42 dias a maioria são CD45-. Isso demonstra que o CD45 não é um pan-marcador de células derivadas da medula óssea (FATHKE et al 2004).

Para determinar a contribuição das linhagens hematopoética e mesenquimal na pele normal e em cicatrização as células EGFP+ foram cultivadas separando-se essas linhagens e transplantando-as separadamente. Foi confirmada a presença de ambas as populações na pele normal. Na pele em cicatrização, houve um aumento de

células da linhagem hematopoética na fase inflamatória precoce da cicatrização enquanto que as células da linhagem mesenquimal mantiveram uma população estável durante todo o processo de cicatrização. Esses dados sugerem que pode haver uma divergência no papel destas duas populações de células (FATHKE et al. 2004).

Fathke et al também caracterizaram funcionalmente as células derivadas da medula óssea que povoam o tecido em cicatrização e demonstraram que elas são positivas para RNAm dos colágenos I e III, além de exibirem a propriedade de contraírem géis de colágeno in vitro (FATHKE et al. 2004).

Finalmente deve ser comentado que porque apenas aproximadamente metade das células da medula óssea nesses camundongos transgênicos expressa EGFP, proteína usada neste estudo para identificar estas células, o grau de contribuição da medula óssea para a pele normal e a pele em cicatrização pode ser bem maior que o sugerido.

### **2.2.8 Fibrócitos**

Em 1994, Bucala et al. identificaram uma subpopulação de células mononucleares com propriedades similares às propriedades dos fibroblastos. Essas células foram denominadas fibrócitos<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> Essa denominação, no entanto, não é ideal, pois o termo fibrócito também aparece na literatura histopatológica como um sinônimo para fibroblastos “maduros”. Em um contexto separado, uma célula chamada fibrócito também é um constituinte do ouvido interno. Talvez um termo mais específico para o fibrócito circulante deva ser considerado. Quan et al. sugeriram denominar esta célula alitofibrócito que incorpora a palavra grega “*alitis*” que significa andarrilho, enfatizando assim o fato de serem células provenientes do sangue (QUAN et al. 2003).

Estudos iniciais em camundongos, que receberam transplante de medula óssea de doares de sexo diferente, mostraram que, depois da reconstituição das receptoras femininas com a medula óssea dos doadores masculinos, os fibrócitos cultivados do sangue periférico originaram-se das células das receptoras e não dos doadores. Baseado neste resultado foi sugerido que os fibrócitos devem ter sua origem no estroma da medula óssea, que é uma malha de células do tecido conjuntivo radorresistente que dá suporte à hematopoeese normal (QUAN et al 2004).

Yang et al. demonstraram que os fibrócitos originam-se de células mononucleares CD14+ do sangue periférico (YANG 2002). A diferenciação das células CD14+ em fibrócitos aumentou quando as culturas CD14+ foram tratadas com meio enriquecido por substâncias secretadas por células CD14-. Isso também aconteceu quando a cultura foi tratada com TGF- $\beta$ 1. A inclusão de anticorpo anti-TGF- $\beta$ 1, nas culturas tratadas com meio enriquecido por substâncias secretadas por células CD14-, bloqueou a indução de fibrócitos nas culturas de células CD14+. Isso levou os autores a sugerirem que o estimulador da diferenciação dos fibrócitos no meio enriquecido é na verdade o TGF- $\beta$ 1 (YANG 2002).

Os fibrócitos também apresentam características de células hematopoéticas, como a expressão de CD34, e são considerados células-tronco derivadas da medula óssea. Eles compreendem 0,5% dos leucócitos circulantes (BUCALA 1994; CHESNEY et al. 1997).

Fibrócitos obtidos do sangue expressam, em cultura, colágeno I, colágeno III e fibronectina (tipicamente produzidos por fibroblastos), assim como CD45RO (antígeno comum a todos os leucócitos), CD13 (antígeno pan-mielóide) e CD34 (antígeno de células tronco hematopoéticas). Fibrócitos não sintetizam marcadores epiteliais (citoqueratina), endoteliais (proteína relacionada ao fator Von Willebrand

VIII) ou de células musculares lisas ( $\alpha$ -actina) e são negativos para estearases não-específicas assim como para marcadores monocíticos/macrofágicos, CD14 e CD16. Os fibrócitos também não expressam proteínas produzidas por células dendríticas ou seus precursores (CD25, CD10 e CD38) ou o antígeno pan de células B (CD19) (BUCALA 1994; CHESNEY et al. 1997). Eles são fontes importantes de fatores de crescimento, citocinas e componentes da MEC (PDGF-A, TGF- $\beta$ 1, M-CSF (fator estimulante de colônia dos macrófagos), MIP-1 $\alpha$  (proteína inflamatória dos macrófagos 1 $\alpha$ ), MIP-2 (proteína inflamatória dos macrófagos 2), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e colágeno I) e podem funcionar atraindo e ativando células inflamatórias e do tecido conjuntivo (BUCALA 1994; CHESNEY 1997).

A produção de colágeno I pelos fibrócitos *in vitro* é regulada por IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ 1 (ABE 2001; CHESNEY 1998). Recentemente foi descrito que os fibrócitos induzem angiogênese tanto *in vitro* como *in vivo* (HARTLAPP 2001).

Também foi descrita a expressão pelos fibrócitos de componentes de superfície sabidamente importantes na apresentação de antígenos como as moléculas MHC-classe II (HLA-DP, -DQ e -DR), as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e as moléculas de adesão CD11a, CD54 e CD58. Os fibrócitos também foram capazes de induzir proliferação de células T dependente de células apresentadoras de antígeno (CHESNEY et al. 1997).

Fibrócitos de camundongos combinados a antígeno e colocados em área de injúria tecidual demonstraram migrar para linfonodos proximais e ativar células T *naive* (CHESNEY et al. 1997). Embora vários tipos celulares sejam capazes de apresentar antígenos às células T de memória, a sensibilização de células T *naive* é considerada uma função particular das células dendríticas (CHESNEY et al. 1997).

Os fibrócitos do sangue periférico podem rapidamente penetrar nos locais de injúria tecidual ao mesmo tempo em que as células inflamatórias. São células aderentes que têm uma morfologia fusiforme e têm a habilidade de produzir proteínas da matriz extracelular em cultura.

Um papel importante para os fibrócitos na cicatrização da pele foi aventado baseado em estudos que demonstraram a migração destas células para o tecido em cicatrização. Estas células localizaram-se em áreas de deposição de colágeno. (BUCALA 1994; CHESNEY et al. 1997). A expressão do receptor de quimiocina CCR7 nos fibrócitos e a interação com quimiocinas linfóides estão envolvidas na migração destas células para o tecido lesado (ABE 2001). A contribuição precisa destas células para a cicatrização não é conhecida.

### **2.3 CÉLULAS FUSIFORMES DÉRMICAS CD34 POSITIVAS**

O antígeno CD34, ou antígeno de células progenitoras humanas, é uma glicoproteína transmembrana de 105-120 kDa feita de uma cadeia codificada em um gene localizado no cromossomo humano 1q32. Embora tenha sido originalmente considerado que essa molécula era expressa especificamente por células-tronco da medula óssea, sabe-se agora que ela também é expressa por outros tipos celulares (não-hematológicos), nas células endoteliais capilares e em células da derme humana (NARVAEZ et al. 1996).

A derme humana tem uma população heterogênea de células de morfologia dendrítica, incluindo os dendrócitos dérmicos, que são fator XIIIa +, e células CD34 + (NARVAEZ et al. 1996).

O primeiro subtipo de células dendríticas dérmicas a ser identificado foram as células dendríticas dérmicas (CDD) fator XIIIa +. Anticorpo anti-fator XIIIa reage com células dendríticas na derme papilar e com algumas células fusiformes na derme reticular (CERIO et al. 1989). Ainda há controvérsia com relação às origens das células fator XIIIa+; Cerio et al. demonstraram que essas células eram células dendríticas derivadas da medula óssea enquanto que Nemeth et al. sugeriram que algumas dessas células são fibroblastos (CERIO et al. 1989; NEMETH et al. 1989).

Em 1991, a célula dendrítica CD34 + foi descrita e posteriormente denominada CDD tipo 2. Outras CDD identificadas após incluem as células de Langerhans transitórias, a célula CD1a indeterminada e a célula CD36+ (GILMOUR et al. 2000).

Narvaez et al. localizaram e caracterizaram imunofenotipicamente a população de células fusiformes (e ocasionalmente dendríticas) CD34 + na pele normal. Elas estão presentes difusamente na derme reticular, ao redor dos folículos pilosos e das glândulas sudoríparas écrinas e expressam antígenos comuns a todas as células mesenquimais (vimentina e o antígeno reconhecido pelo anticorpo Te7). Ao contrário das células de Langerhans, as células CD34+ não expressam CD1a e proteína S100; não são detectadas na epiderme e não têm grânulos de Birbeck. Diferente dos dendrócitos dérmicos, elas não expressam fator XIIIa, CD36 ou CD1a; além disso as células CD34+ localizam-se predominantemente na derme reticular e profunda ao invés de na derme papilar. Contrastando com as células da linhagem monocítica-macrofágica e com as células apresentadoras de antígeno, as células CD34+ não expressaram CD11a/LFA-1, CD14, CD36 ou CD54/ICAM-1. Ao contrário

dos miofibroblastos, não expressam actina músculo-específica e não exibem miofilamentos ultra-estruturalmente. Finalmente, essas células dérmicas diferenciam-se dos fibroblastos comuns porque estes últimos não expressam CD34 e são, enzimaticamente e ultra-estruturalmente, dotados de equipamento para atividade sintética, uma característica que as células CD34 + não possuem. Eles concluíram que as células dendríticas dérmicas CD34 + são células mesenquimais que representam uma população distinta, devido a sua distribuição peculiar e ao seu imunofenótipo único, que claramente as diferencia de outras células cutâneas de morfologia dendrítica. (NARVAEZ et al. 1996).

A presença das células dérmicas CD34 positivas na pele humana sugere que esta célula tenha um papel na fisiologia da pele. No entanto, este papel ainda é obscuro (NARVAEZ et al. 1996).

Células CD34+ estão presentes nos dermatofibrosarcoma protuberans (ABENOZA et al. 1993), nos cilindromas (TELLECHEA et al. 1995), nos tricoepiteliomas (KIRCHMAN et al. 1994), no entanto, não há evidência de relação delas com a proliferação tumoral.

Narvaez et al. acharam uma pequena percentagem de células CD34+ na derme média que expressavam antígenos HLA-DR, mas os seus resultados não deram suporte à hipótese que as células CD34+ poderiam ser imunologicamente ativas, como células apresentadoras de antígeno (NARVAEZ et al. 1996).

Digno de nota é o fato de que células fusiformes CD34+ de lesões de sarcoma de Kaposi podem conter depósitos de hemossiderina, sugerindo uma capacidade fagocítica (NICKOLOFF 1991). Se essa capacidade também é exibida pelas células dendríticas dérmicas CD34+ permanece desconhecido.

Aiba et al. relataram desaparecimento seletivo de células fusiformes CD34+ nas lesões de pele de Esclerodermia de 27 pacientes, sendo 16 casos de Esclerose Sistêmica e 11 casos de Morfêia. Além disso, embora tenham sido identificadas células CD34+ na pele não acometida clinicamente, elas foram menos freqüentes que na pele normal (AIBA et al. 1994). Isto foi confirmado por Skobieranda et al. que encontraram um número significativamente menor de células dendríticas CD34+ na pele lesional de 26 pacientes com Morfêia (SKOBIERANDA et al. 1995) e sugeriram que a ausência de marcação de CD34 pode ser usada como marcador para Morfêia. Aiba et al. e Skobieranda et al. utilizaram-se de imunomarcações complementares em seus trabalhos e demonstraram que entre as várias populações de células dérmicas fusiformes parece haver diminuição seletiva apenas da população CD34 positiva (AIBA et al. 1994; SKOBIERANDA et al. 1995).

Camacho et al., por sua vez, relataram um aumento de células dendríticas dérmicas CD34+ após fototerapia com UVA-1, que se associou à melhora clínica, em pacientes com Morfêia. (CAMACHO et al. 2001)

McNiff et al. mostraram perda das células fusiformes CD34+ em seis casos de Morfêia superficial. Essa perda foi restrita à área de colágeno alterado em quatro dos seis casos (MCNIFF et al. 1999).

Gilmour et al. dividiram as biópsias de 33 pacientes com Morfêia em quatro estágios progressivos: indeterminado, inflamatório, inflamatório e esclerótico, e esclerótico. Houve um decréscimo progressivo do número de células CD34+ e um aumento paralelo das CDD XIIIa+ na derme à medida que o estágio histológico avançava. Neste estudo foi questionado se estas células teriam um papel direto na produção de colágeno (GILMOUR et al. 2000). No entanto, Aiba et al. encontraram um número

menor de células fator XIIIa+ nas lesões de Esclerodermia que na pele normal (AIBA 1994).

Um aumento dos níveis de fator XIIIa foi achado em várias condições fibroproliferativas. Histiocitomas, pápula fibrosa do nariz e fibroxantomas atípicos contém células fator XIIIa positivas enquanto cicatrizes, quelóides e dermatofibrosarcomas não têm (CERIO et al. 1989).

Um trabalho com pacientes com fibrose peritoneal induzida por diálise mostrou que a perda da expressão de CD34 correlacionou-se com o grau de fibrose peritoneal (JIMENEZ-HEFFERNAN et al. 2004).

Ainda não existe um consenso sobre a função ou origem destas células CD34+ embora muitas especulações tenham sido feitas. Até o momento as seguintes hipóteses foram aventadas:

- Esta população poderia representar uma população de células tronco que gera as CDD XIIIa+ (ALTMAN et al. 1993; NICKOLOFF 1991; SUEKI et al. 1993).

Narvaez et al. discordam desta hipótese, pois no seu estudo não detectaram células co-expressando fator XIIIa e CD34, nem observaram formas intermediárias entre estas duas células. Os autores argumentam ainda que fala contra a origem comum destas duas células o imunofenótipo de alguns tumores dérmicos de células fusiformes: dermatofibromas são XIIIa positivos/CD34 negativos e dermatofibrosarcomas protuberans são XIIIa negativos/CD34 positivos (NARVAEZ et al. 1996).

- As células CD34+ poderiam ser alvos dos auto-anticorpos da Esclerodermia (AIBA et al. 1994).

Fala contra esta hipótese o fato destas células também estarem diminuídas nos pacientes com Morféia, que raramente tem auto-anticorpos positivos.

- As células CD34+ poderiam ter um papel regulador na fibrose cutânea e na síntese de colágeno e sua perda poderia resultar, então, numa perda do controle da colagenogênese na derme (AIBA et al. 1994; SKOBIERANDA et al. 1995).
- As células CD34+ podem representar um conjunto de células-tronco mesenquimais não-comprometidas. Com um estímulo particular, elas talvez possam se diferenciar em tipos celulares dérmicos mais diferenciados (como fibroblastos, células apresentadoras de antígenos ou dendrócitos dérmicos fator XIIIa+) (NARVAEZ et al. 1996).

### 3 OBJETIVOS

---

- Localizar e quantificar as células CD34 positivas na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica, e compará-la com a pele de indivíduos saudáveis.
- Correlacionar o tempo de evolução da doença com a presença de células CD34 positivas.
- Correlacionar o grau de fibrose com a presença de células CD34 positivas.

## **4 METODOLOGIA**

---

### **4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Diagnóstico clínico de Esclerose Sistêmica segundo os critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (MASI et al. 1980) e/ou diagnóstico histológico
- Maiores de 18 anos

### **4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- Menores de 18 anos
- Mulheres grávidas
- Pessoas alérgicas a anestésicos locais

### **4.3 SELEÇÃO DO MATERIAL E PREPARAÇÃO**

Fragmentos de biópsia de 26 pacientes com Esclerose Sistêmica foram analisados. Destes pacientes, 18 foram biopsiados para projeto de pesquisa anteriormente realizado no Serviço de Histologia e Embriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (SALGADO 2000) e 8 foram selecionados no ambulatório de dermatologia do Hospital Clementino Fraga Filho. Segundo orientação do Comitê de Ética do

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, foi obtida autorização do chefe do Serviço de Histologia e Embriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto para utilização dos fragmentos de arquivo neste trabalho. Os fragmentos de pele são foram obtidos de voluntários sem doença cutânea e de pele excedente de cirurgias para doenças não-dermatológicas, provenientes de clínica privada. Todos os pacientes biopsiados assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

As novas biópsias foram realizadas seguindo a mesma metodologia empregada na realização das biópsias de arquivo. Foi retirado material da pele, sob anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor, utilizando-se *punchs* de 4 mm. O material fixado em formol a 10% foi enviado para o Serviço de Histologia e Embriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, onde foi incluído em parafina para realização de imunohistoquímica.

#### **4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

##### **Cálculo do tamanho da amostra**

Em virtude de termos poucos trabalhos com a mesma temática publicados, e de alguns dados essenciais não estarem disponíveis na maioria destas publicações, não foi possível definir por cálculos estatísticos precisos o tamanho da amostra. Como esperávamos que a diferença entre o número de células CD34+ na pele normal e na pele esclerodérmica fosse ampla, como foi visto nos estudos precedentes, definimos em 20 o número mínimo de pacientes e em 10 o número mínimo de controles. Estes números são da mesma ordem de grandeza que os dos outros trabalhos publicados, onde demonstraram ser

suficientes para atingir significância estatística (AIBA et al. 1994, CAMACHO et al. 2001, GILMOUR et al. 2000, SKOBIERANDA et al. 1995).

### **Pacientes**

Foram analisadas biópsias de 26 pacientes, 24 mulheres e 2 homens. Doze pacientes eram brancos e 14 eram não-brancos. A idade média foi de 41,15 anos. O tempo médio da evolução da doença foi de 38,19 meses. 19 indivíduos apresentavam a forma difusa da doença, 4 apresentavam a forma limitada e 3 tinham Esclerose Sistêmica com superposição de outras doenças do tecido conjuntivo (1 com ES + artrite reumatóide juvenil, 1 com ES + artrite reumatóide e 1 com ES + dermatomiosite). Todas as biópsias foram obtidas do antebraço, local citado por Rodnan et al. (1979) como preferencial para realização de biópsias cutâneas em pacientes com ES (apud SALGADO 2000).

### **Controles**

Foram analisadas biópsias de 10 indivíduos saudáveis, 6 homens e 4 mulheres. Oito indivíduos eram brancos e 2 eram não-brancos. A idade média foi de 35,3 anos. Quatro biópsias foram obtidas do braço, duas do antebraço, duas do abdome e duas do prepúcio. A obtenção da amostra de locais diversos aconteceu devido ao fato de que amostras de pele foram obtidas de pele excedente de cirurgias.

Tabela 1 - Descrição de cada paciente quanto ao sexo, cor, idade, tempo de evolução da doença, grau de fibrose e forma clínica

	Sexo	Cor	Idade (anos)	Tempo de doença (meses)	Grau de fibrose <sup>4</sup>	de	Forma clínica
1	F	B	34	48	FI		CREST
2	F	B	23	22	FL		SP:ARJ
3	F	B	19	8	FL		D
4	F	NB	32	18	FI		D
5	F	NB	42	23	FI		D
6	F	B	61	22	FI		D
7	F	NB	32	24	FL		D
8	F	B	32	36	FI		SP:AR
9	F	B	68	24	FI		D
10	M	NB	45	12	FI		D
11	F	NB	44	20	FI		D
12	F	NB	32	36	FI		D
13	F	NB	39	07	FL		D
14	F	NB	46	60	FL		CREST
15	F	B	50	60	FL		CREST
16	F	B	39	12	FL		SP:DM
17	F	B	27	36	FL		D
18	F	B	20	20	FI		D
19	F	NB	43	48	NA		D
20	M	NB	45	42	NA		CREST
21	F	NB	63	5	NA		D
22	F	B	68	72	NA		D
23	F	NB	48	48	NA		D
24	F	NB	42	02	NA		D
25	F	NB	39	12	NA		D
26	F	B	37	276	NA		D

F= feminino M= masculino B= branca NB= não branca FI=fibrose intensa FL= fibrose leve NA= não avaliado D= difusa SP= superposição AR= artrite reumatóide ARJ= artrite reumatóide juvenil DM= dermatomiosite

<sup>4</sup> O grau de fibrose foi avaliado por Salgado (SALGADO 2000) em trabalho anterior usando a metodologia descrita adiante na seção “Quantificação e avaliação dos cortes corados”.

Tabela 2 - Descrição de cada controle quanto ao sexo, cor, idade e local da biópsia

	Sexo	Cor	Idade	Local
1	F	B	33	braço
2	M	B	65	braço
3	M	NB	27	antebraço
4	F	B	58	antebraço
5	F	B	31	braço
6	M	B	27	abdome
7	F	NB	21	braço
8	M	B	26	prepúcio
9	M	B	47	abdome
10	M	B	18	prepúcio

F= feminino M= masculino B= branca NB= não branca

#### 4.5 IMUNOISTOQUÍMICA

Os materiais fixados em formol a 10% e incluídos em parafina foram cortados (5 µm) e montados em lâminas de vidro. Os cortes foram desparafinados em xilol e rehidratados em banhos crescentes de álcool. Após cinco minutos de imersão em tampão fosfato tamponado (PBS) a 37°C, foi feita a recuperação antigênica, com imersão em tripsina 0,1% (Difco Laboratories; Detroit, MI) em estufa a 37° Celsius por 30 minutos. Após lavagem com PBS, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação em peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos. Em seguida, foram feitas lavagens em água corrente e em PBS. O anticorpo primário foi aplicado aos cortes e incubado por uma noite a uma temperatura de 4°C. Para a detecção de células positivas para CD34 foi utilizado o anticorpo anti-CD34 pré-diluído pelo laboratório que o fornece (Novocastra). Em seguida foram feitas duas lavagens com PBS para eliminar o anticorpo primário e foi feita a revelação com o sistema EnVision (DAKO) por uma hora. Duas novas lavagens com PBS foram realizadas e então foi aplicada a diaminobenzidina (DAB) como cromógeno por um minuto. Os cortes foram então lavados em água corrente e os núcleos foram corados com hematoxilina de Delafield por um minuto. Após nova lavagem foram desidratados em banhos decrescentes de álcool e clarificados em xilol. Controles negativos foram realizados substituindo o anticorpo primário por soro não imune, e nenhuma marcação foi observada. A expressão normal de CD34 pelas células endoteliais serviu como controle positivo (controle positivo interno).

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS CORTES CORADOS

O número de células CD34 positivas foi contado com aumento de 40 vezes usando uma moldura bidimensional com área-teste de  $3.636 \mu\text{m}^2$  (sistema-teste M42) (figura 8) e os dados foram expressos em células CD34 positivas/ $\text{mm}^2$ .

Para a contagem, um sistema vídeo-microscópio (microscópio Axiophot ZEISS, vídeo-camera JVC, e monitor Sony Trinitron) foi usado. O sistema-teste foi posicionado sobre a tela do monitor e calibrado com um micrômetro.

Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão.

A marcação foi analisada em cinco campos aleatórios na derme superficial e cinco campos na derme profunda por dois observadores independentes.

As imagens foram capturadas em um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera Olympus DP 70, em campo claro.

Os dados relativos ao grau de fibrose encontrado nas biópsias foram obtidos de trabalho anterior (SALGADO 2000). Este trabalho avaliou a fibrose de acordo com a organização das fibras colágenas e a coloração sob polarização, utilizando-se a coloração pelo Picrosirius, segundo método descrito por Yamamoto et al. (YAMAMOTO et al. 1995). Foram atribuídos graus de 0 a 2 (0= normal, 1= moderado, 2=intensa) para a derme papilar e reticular separadamente. Se a soma das notas da derme papilar fosse igual a 1 ou 2 a biópsia era classificada como fibrose leve, se a soma fosse igual a 3 ou 4 a biópsia era classificada como fibrose intensa.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi usado o *software* Graph Pad InStat versão 3.01 (GraphPad Software Inc.; CA, USA), e valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Teste de Wilcoxon (teste pareado não paramétrico) foi realizado para verificar a variabilidade das medidas entre os observadores. Não houve diferença significativa entre as medidas. Teste de Mann-Whitney (teste não pareado não paramétrico) foi usado para comparar os grupos de pele normal e Esclerose Sistêmica.

## 5 RESULTADOS

---

As células dérmicas CD34 positivas estão diminuídas nos pacientes com ES, quando comparados ao grupo controle, tanto na derme papilar ( $83 \text{ céls/mm}^2 \pm 9,2 \times 622 \text{ céls/mm}^2 \pm 59$ ;  $p < 0,0001$ ) (gráfico 1) quanto na derme reticular ( $98 \text{ céls/mm}^2 \pm 14 \times 771 \text{ céls/mm}^2 \pm 49$ ;  $p < 0,0001$ ) (gráfico 2). Essas células localizaram-se predominantemente na derme reticular em ambos os grupos e também foram vistas ao redor dos folículos e das glândulas sudoríparas écrinas.

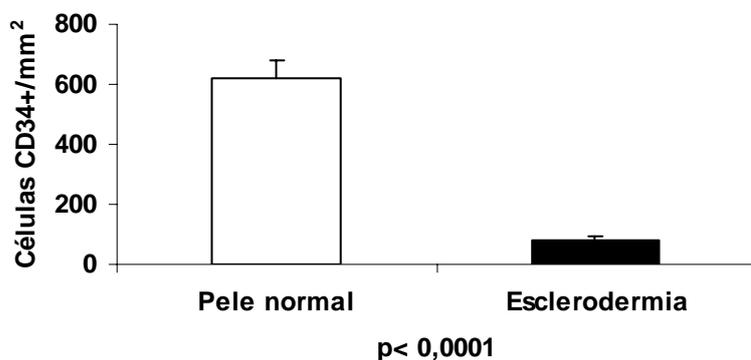


Gráfico 1. Número de células CD34+/mm<sup>2</sup> na derme papilar da pele normal e da pele dos pacientes com Esclerose Sistêmica.

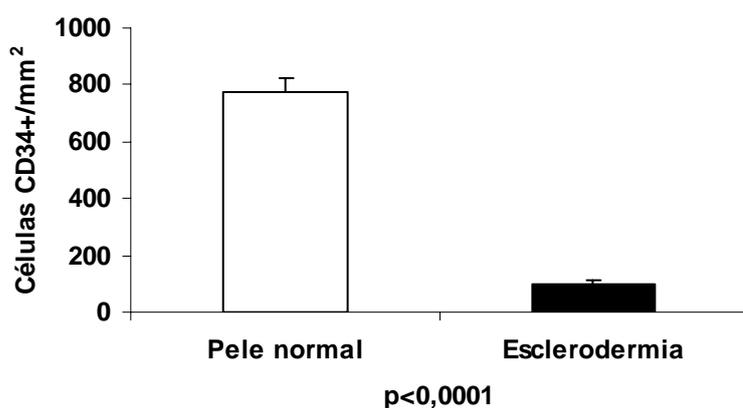


Gráfico 2. Número de células CD34+/mm<sup>2</sup> na derme reticular da pele normal e da pele dos pacientes com Esclerose Sistêmica.

Houve diferença estatisticamente significativa entre aqueles com 12 meses ou menos de doença e aqueles entre 13 e 24 meses (124 céls/mm<sup>2</sup> ± 18 x 75 céls/mm<sup>2</sup> ± 16;  $p < 0,05$ ), no entanto, não houve diferença entre o grupo com 12 meses ou menos e aqueles com mais de 24 meses (124 céls/mm<sup>2</sup> ± 18 x 91 céls/mm<sup>2</sup> ± 12;  $p > 0,05$ ) e entre o grupo entre 13 e 24 meses e aquele com mais de 24 meses (75 céls/mm<sup>2</sup> ± 16 x 91 céls/mm<sup>2</sup> ± 12;  $p > 0,05$ ).

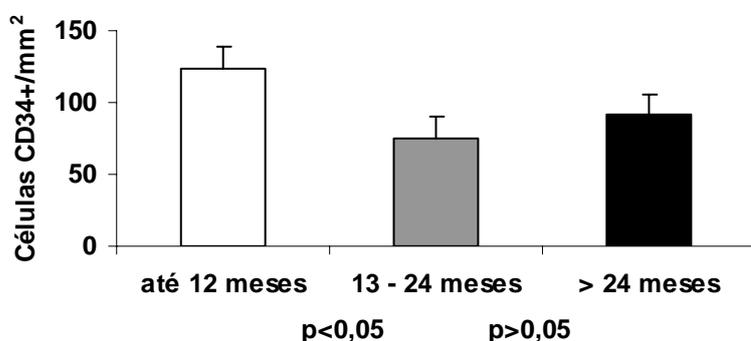


Gráfico 3. Número de células CD34+ na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica (derme papilar + reticular) de acordo com o tempo de evolução da doença.

Nos três grupos a contagem de células foi significativamente menor ( $P < 0,0001$ ) que na pele normal.

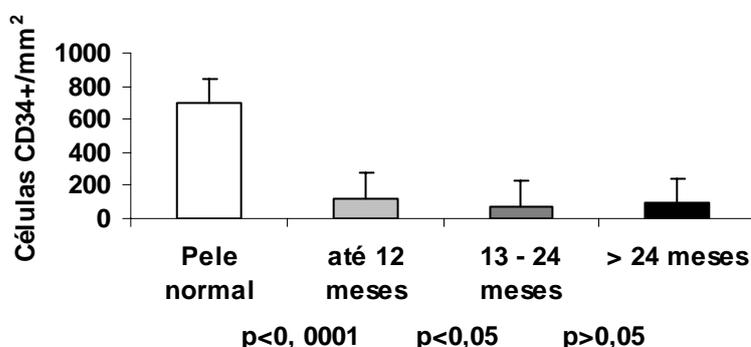


Gráfico 4. Número de células CD34+ na pele normal e na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica (derme papilar + reticular) de acordo com o tempo de evolução da doença.

Nos 18 casos em que a fibrose pôde ser classificada, aqueles que apresentavam fibrose intensa tiveram menos células positivas ( $70 \text{ céls/mm}^2 \pm 9$ ) que aqueles com fibrose leve ( $103 \text{ céls/mm}^2 \pm 19$ ), mas isto não foi estatisticamente significativo.

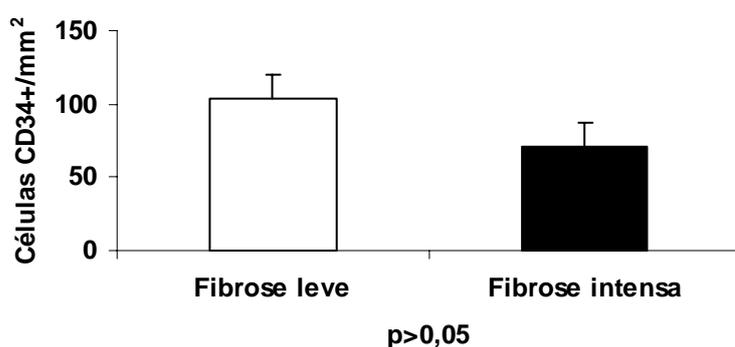


Gráfico 5. Número de células CD34+ na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica (derme papilar + reticular) de acordo com o grau de fibrose observado.

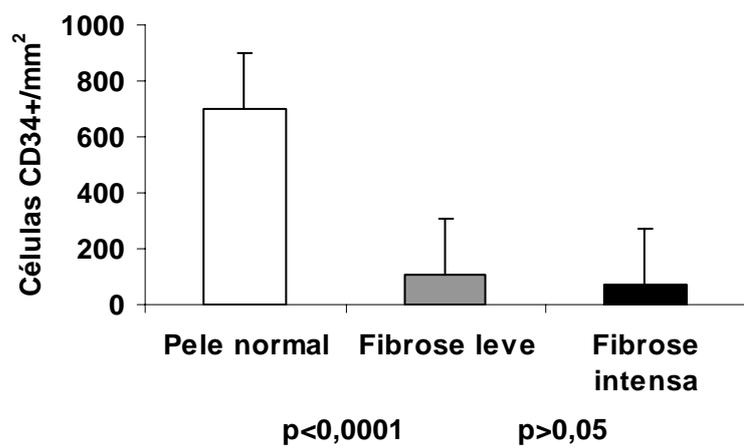


Gráfico 6. Número de células CD34+ na pele normal e na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica (derme papilar + reticular) de acordo com o grau de fibrose observado.

## ILUSTRAÇÕES

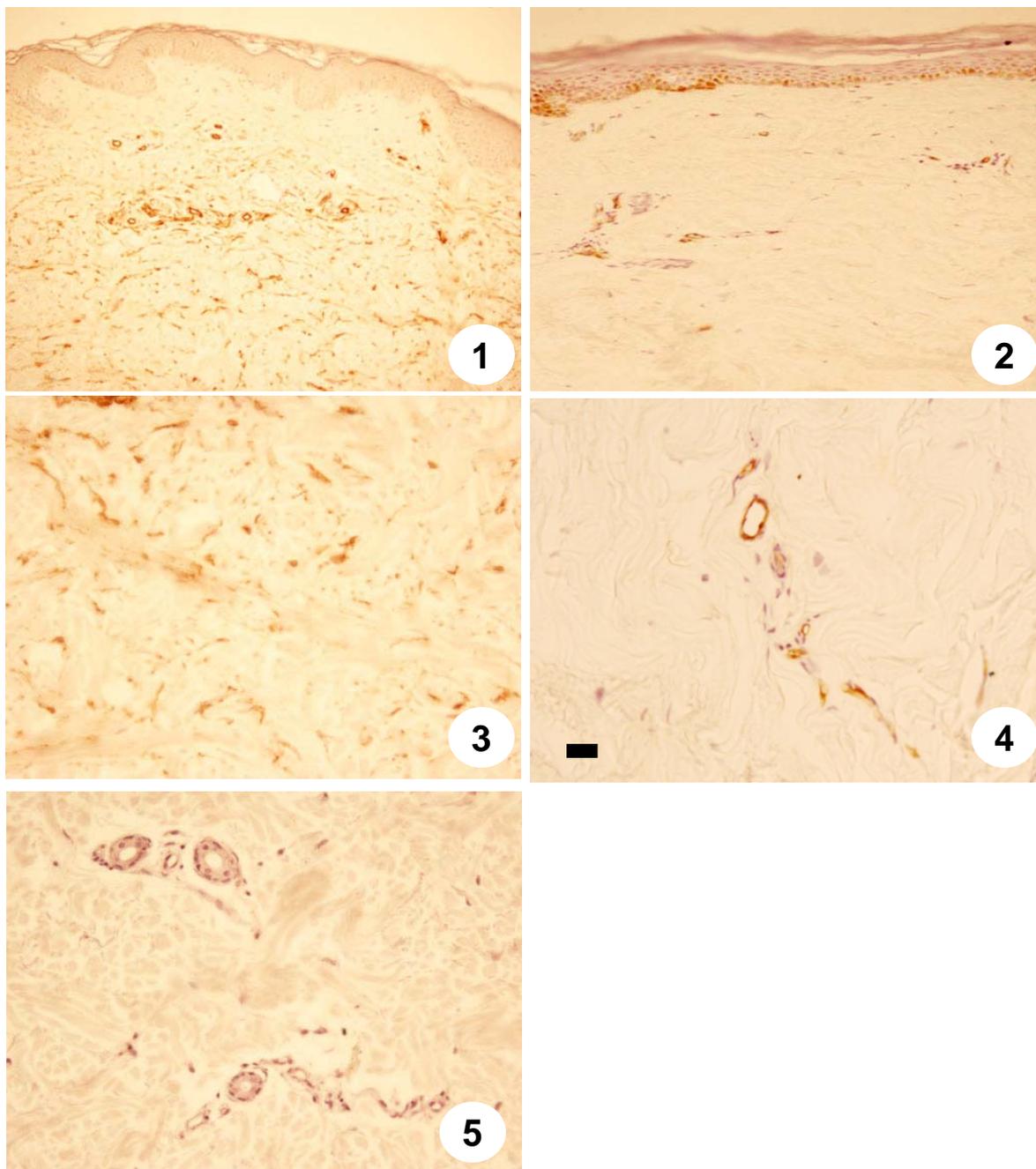


Figura 1 - Pele sã. Numerosas células CD34 + na derme.

Figura 2 - Pele com Esclerodermia. Ausência quase completa de células CD34+.

Figura 3 - Pele sã. Numerosas células CD34 + na derme.

Figura 4 - Pele com Esclerodermia. Ausência quase completa de células CD34+. Vasos marcados.

Figura 5 - Controle negativo.

Barra negra corresponde a 40 $\mu$ m nas figuras 1 e 2 e a 20 $\mu$ m nas figuras 3-5.

## ILUSTRAÇÕES

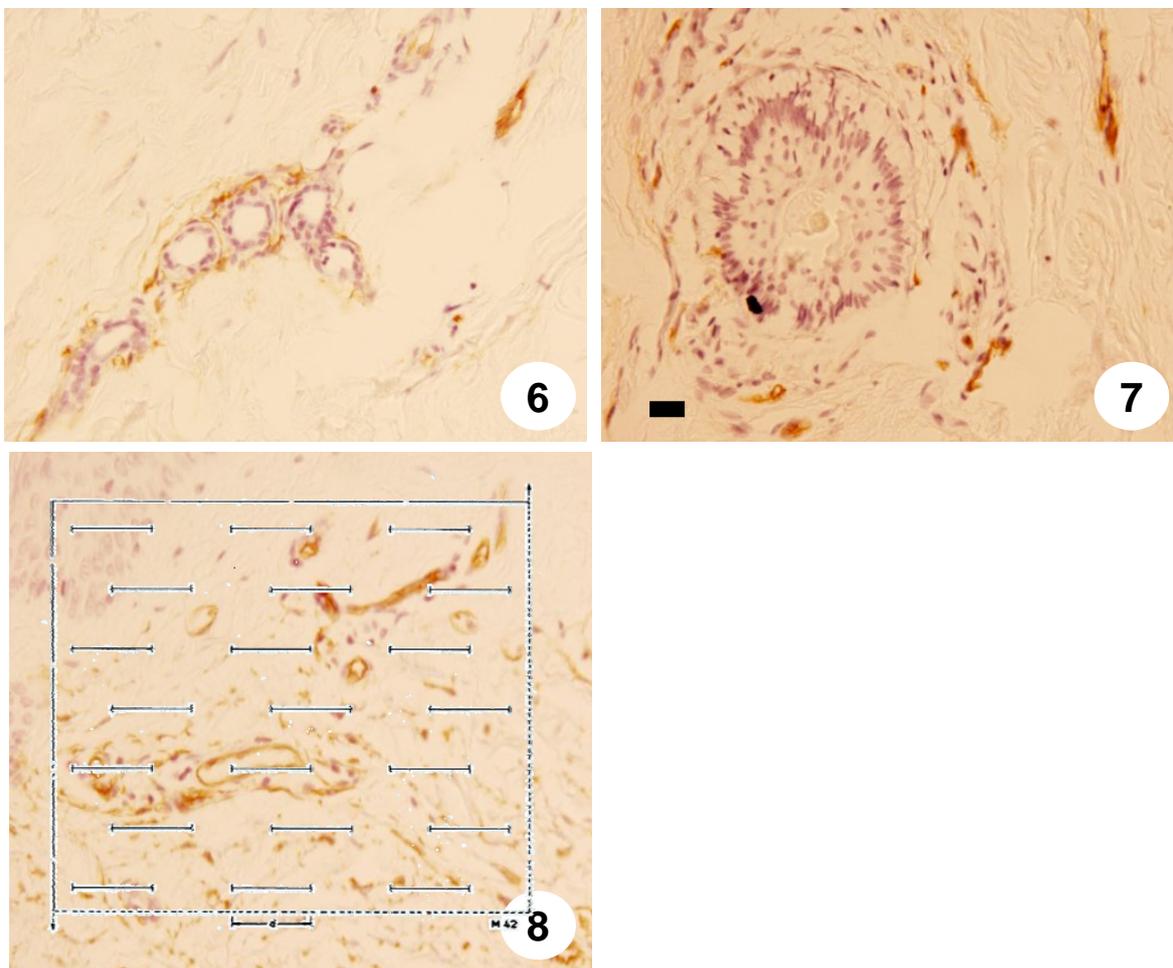


Figura 6 - Células CD34+ ao redor das glândulas sudoríparas.

Figura 7 - Células CD34 + ao redor do folículo piloso.

Figura 8 – Sistema-teste M42.

Barra negra corresponde a 20 $\mu$ m nas figuras 6-8.

## 6 DISCUSSÃO

---

Este estudo mostrou que há diminuição das células CD34 positivas na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica. As células CD34 positivas localizaram-se predominantemente na derme reticular e perianexial como descrito por outros autores (NARVAEZ et al. 1996). A redução destas células ocorreu precocemente na evolução da doença, já sendo notada nos pacientes com 1 ano ou menos de evolução. Não houve correlação estatisticamente significativa entre o grau de fibrose e o número de células CD34 positivas. Isto parece sugerir que a diminuição das células CD34 positivas precede o aparecimento da fibrose e que não é a fibrose a responsável pela diminuição da celularidade. A diminuição das células CD34 positivas na pele com Esclerodermia também foi relatada por outros autores (AIBA et al. 1994; SKOBIERANDA et al. 1995; GILMOUR et al. 2000). Aiba et al. relataram o desaparecimento das células CD34 positivas em 27 pacientes com Esclerodermia (16 com ES e 11 com Morféia) (AIBA et al. 1994). Skobieranda et al., por sua vez, demonstraram diminuição destas células em 26 pacientes com Morféia (SKOBIERANDA et al. 1995). A correlação entre o número de células CD34 positivas e o estágio histológico foi relatada em um trabalho com 33 casos de Morféia (GILMOUR et al. 2000). Neste estudo, os autores relataram diminuição progressiva das células CD34 positivas com o avanço do grau histológico da doença. No entanto, Aiba et al. não encontraram diferença entre o estágio inicial inflamatório e o estágio fibrótico mais avançado, nos 16 casos de ES analisados por eles (AIBA et al. 1994). No nosso estudo percebemos uma tendência à diminuição

mais acentuada das células CD34 positivas no grupo com fibrose mais avançada, no entanto a diferença entre os grupos não atingiu significância estatística.

A origem e a função destas células dérmicas CD34 positivas ainda são nebulosas. Em 1991, Nickoloff sugeriu que células progenitoras hematopoéticas poderiam estar presentes na circulação sanguínea em pequeno número e poderiam migrar para a pele, originando então a população de células dendríticas dérmicas CD34+ (NICKOLOFF 1991). Na dermatopatia fibrosante nefrogênica, uma doença esclerótica da pele, Esclerodermia-símile, a marcação imunoistoquímica do material de biópsia revela que células fusiformes com marcação dupla positiva para CD34 e pró-colágeno constituem o componente dominante das lesões. Observações iniciais sugeriram que estas células da dermatopatia fibrosante nefrogênica são fibrócitos circulantes que se realocaram na derme (COWPER 2003). Parece-nos razoável indagar se estas células dérmicas CD34 positivas não seriam fibrócitos provenientes da circulação periférica que teriam se deslocado para a derme. Dá suporte à nossa hipótese o fato do imunofenótipo atribuído a ambos os tipos celulares ser muito semelhante (vide tabela).

Tabela 3 - Imunofenótipo dos fibrócitos e das células dérmicas CD34 positivas

	Fibrócitos	Células dérmicas CD34+
CD10	- <sup>1</sup>	?
CD11a	+ <sup>2</sup>	- <sup>5</sup>
CD13	+ <sup>1</sup>	?
CD14	- <sup>1</sup>	- <sup>5</sup>
CD16	- <sup>1</sup>	?
CD19	- <sup>1</sup>	?
CD25	- <sup>1</sup>	- <sup>5</sup>
CD1a	- <sup>3</sup>	- <sup>5</sup>
CD34	+ <sup>1</sup>	+ <sup>5</sup>
CD36	?	- <sup>5</sup>
CD38	- <sup>1</sup>	?
CD45RO	+ <sup>1</sup>	- <sup>5</sup>
CD54	+ <sup>2</sup>	- <sup>5</sup>
CD58	+ <sup>2</sup>	?
CD80	+ <sup>2</sup>	-
CD86	+ <sup>2</sup>	?
Colágeno I	+ <sup>1</sup>	?
Colágeno III	+ <sup>1</sup>	?
Fator XIIIa	?	- <sup>5</sup>
Fibronectina	+ <sup>1</sup>	?
MHC-II	+ <sup>2</sup>	+
S100	?	- <sup>5</sup>
Te7	?	+ <sup>5</sup>
Vimentina	+ <sup>4</sup>	+ <sup>5</sup>
α-SMA	- (sangue periférico) <sup>1</sup> + (cultura) <sup>3</sup>	- <sup>5</sup>

1= BUCALA et al. 1994 2= CHESNEY et al. 1997 3= PILLING et al. 2003 4= HARTLAPP et al . 2001  
5= NARVAEZ et al. 1996

A habilidade dos fibrócitos de recrutar e ativar células T e secretar colágeno tipo-I sugere que essas células podem ter um papel crítico em algumas doenças do tecido conjuntivo. Uma resposta de ativação persistente de fibrócitos/ células T poderia levar a uma fibrose patológica (CHESNEY et al. 1997).

Chesney et al. sugerem que os fibrócitos podem contribuir para a fibrose excessiva associada com várias doenças auto-imunes que envolvem ativação persistente de

células T, como a Esclerodermia e a doença enxerto versus hospedeiro (Chesney et al. 1997).

Estudos realizados com fígados de camundongos com esquistossomose (doença parasitária caracterizada por reação fibrótica, mediada por células T, contra ovos retidos na circulação hepática e pulmonar) mostraram que numerosos fibrócitos localizam-se nas áreas de deposição de tecido conjuntivo (CHESNEY et al. 1998).

Abe et al. demonstraram que o TGF- $\beta$ 1 aumenta a proliferação, a produção de colágeno e a expressão de  $\alpha$ -SMA pelos fibrócitos cultivados e sugerem que estes achados implicam os fibrócitos nos processos fibróticos dependentes de TGF- $\beta$  *in vivo* (ABE et al 2001). Este é o caso da Esclerodermia.

Esses dados parecem sugerir que os fibrócitos contribuem para a fibrose patológica. No entanto, se os fibrócitos originam a população de células dérmicas CD34 positivas e contribuem para a fibrose excessiva, o que explicaria a diminuição desta população na pele de pacientes com Esclerodermia?

Acreditamos que o desaparecimento ou diminuição das células CD34 positivas na pele com Esclerodermia possa ser explicado pela perda de marcação para CD34 ao haver diferenciação destes fibrócitos em miofibroblastos, a exemplo do que ocorre no modelo animal de cicatrização de feridas proposto por Mori et al. (2005) e no modelo animal de remodelamento das vias aéreas proposto por Schmidt et al. (2003). Mori et al. comentam em seu trabalho que a identificação dos fibrócitos como células que co-expressam colágeno I e CD34 ou colágeno I e CD45 pode subestimar enormemente seu número nos sítios de injúria tecidual. Os experimentos *in vitro* descritos por eles mostram que 26.8% dos fibrócitos circulantes tornaram-se CD13-/CD45-/CD34-, ao mesmo tempo em que adquiriram um fenótipo miofibroblástico, quando estimulados com TGF- $\beta$ 1 por 7 dias em cultura (MORI et al. 2005).

Schmidt et al. injetaram fibrócitos marcados na circulação periférica de camundongos num modelo animal de asma. A maioria desses fibrócitos expressava CD34 e colágeno I e apenas alguns expressavam  $\alpha$ -SMA. Após 24 horas a análise do tecido das vias aéreas dos camundongos expostos ao alérgeno revelou numerosas células marcadas enquanto poucas estavam presentes nos controles, demonstrando a migração dos fibrócitos circulantes para a área de injúria tecidual. No grupo exposto, a maioria dos fibrócitos marcados se localizou na área subepitelial, justamente onde se detecta a deposição de colágeno I. A cultura de fibrócitos com as citocinas pró-inflamatórias TGF- $\beta$  e ET-1 aumentou a taxa de proliferação dos fibrócitos de forma tempo e dose-dependente. Além disso, o TGF- $\beta$ 1 acelerou e aumentou a liberação de colágeno III e fibronectina, também de forma tempo-dependente e dose-dependente. A cultura ainda levou os fibrócitos a se diferenciarem em miofibroblastos. O aumento da expressão de  $\alpha$ -SMA na cultura foi associado com redução paralela na expressão de CD34 (SCHMIDT et al. 2003).

Em outro estudo foi demonstrado que os fibrócitos da pele de camundongos em processo de cicatrização diferenciam-se em miofibroblastos, adquirindo marcação para  $\alpha$ -SMA e perdendo a marcação para CD45 e CD34. O aumento da marcação para  $\alpha$ -SMA foi precedido e associado com aumento nas concentrações tissulares de TGF- $\beta$ 1, uma citocina que desempenha papel fundamental na cicatrização de feridas (WERNER et al. 2003) e promove diferenciação miofibroblástica (WERNER et al. 2003; GABBIANI 2003).

Sugerimos que as células dérmicas CD34+ podem então estar com seu número subestimado por serem fibrócitos que já completaram sua diferenciação. O estímulo para a diferenciação destes fibrócitos deve ser o TGF- $\beta$ , fator de crescimento com

níveis aumentados na Esclerodermia e que estimula a diferenciação dos fibrócitos em miofibroblastos.

## 7 CONCLUSÕES

---

1. As células CD34 positivas localizam-se predominantemente na derme reticular tanto nos pacientes como nos controles.
2. As células CD34 positivas estão diminuídas na pele de pacientes com Esclerose Sistêmica.
3. A diminuição das células CD34 positivas ocorre precocemente, podendo ser notada em pacientes com 1 ano ou menos de evolução da doença.
4. O número de células CD34 positivas é menor nos pacientes com fibrose intensa que naqueles com fibrose leve, no entanto essa diferença não é estatisticamente significativa.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABE R, DONNELLY SC, PENG T et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001; 166(12):7556-62.

ABENOZA P, LILLEMOE T. CD34 and factor XIIIa in the differential diagnosis of dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Dermatopathol* 1993; 15(5): 429-434.

ACKERMAN BA. In: *Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases: an algorithmic method based on pattern analysis*. 2 ed, Ed. Pennsylvania: Williams e Wilkins, 1997: 95-96.

AIBA S, TABATA N, OHTANI H et al. CD34+ spindle-shaped cells selectively disappear from the skin lesions of scleroderma. *Arch Dermatol* 1994;130: 593-597.

AL-SABBAGH MR, STEEN VD, ZEE BC et al. Pulmonary arterial histology and morphometry in systemic sclerosis: a case-control autopsy study. *J Rheumatol* 1989; 16(8):1038-1042.

ARNETT FC, CHO M, CHATTERJEE S et al. Familial occurrence frequencies and relative risk for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1359-1362.

ARTLETT CM. Microchimerism and scleroderma: an update. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5(2):154-159.

BEON M, HARLEY RA, WESSELS A et al. Myofibroblast induction and microvascular alteration in scleroderma lung fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(6):733-742.

BOU-GHARIOS G, OSMAN J, BLACK C et al. Excess matrix accumulation in scleroderma is caused partly by differential regulation of stremelysin and TIMP-1 synthesis. *Clin Chim Acta* 1994; 231: 69-78.

BRITTAN M, HUNT T, JEFFERY R et al. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* 2002; 50: 752-757.

BUCALA R, SPIEGEL LA, CHESNEY J et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994 Nov; 1(1):71-81.

CAMACHO NR, SÁNCHEZ JE, MARTIN RF et al. Medium-dose UVA1 phototherapy in localized scleroderma and its effect in CD34-positive dendritic cells. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45(5): 697-699.

CERIO R, GRIFFITHS CEM, COOPER KD et al. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* 1989; 121: 421-431.

CHESNEY J, BUCALA R. Peripheral blood fibrocytes: novel fibroblast-like cells that present antigen and mediate tissue repair. *Biochem Soc Trans* 1997; 25(2):520-4.

CHESNEY J, METZ C, STAVITSKY A et al. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 1998; 160: 419-425.

CHIZZOLINI C, RASCHI E, REZZONICO R et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1602-1613.

COWPER, S.E. Nephrogenic fibrosing dermopathy: the first 6 years. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15(6): 785-790.

DANIEL C, TAKABATAKE Y, MIZUI M et al. Antisense oligonucleotides against thrombospondin-1 inhibit activation of tgf-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *Am J Pathol* 2003; 163(3):1185-1192.

DENTON CP, BLACK CM. Scleroderma- clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18(3): 271-290.

DERK CT, JIMENEZ SA. Systemic Sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmunity reviews* 2003; 2: 181-191.

DISTLER O, DEL ROSSO A, GIACOMELLI R et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* 2002; 4(6): R11.

ELDER D, ELENITSAS R, JOHNSON Jr B et al. Infiltrados Perivasculares, Difusos e Granulomatosos da Derme Reticular. *Doenças das Fibras da Matriz Dérmica*. In: *Histopatologia da Pele de Lever*. 1ed, Ed. Manole, 2001: 235-7.

FATHKE C, WILSON L, HUTTER J et al. Contribution of bone-marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 2004; 22:812-822.

FEGHALI-BOSTWICK C, MEDSGER TAJ, WRIGHT TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1956-1963.

FUJIMOTO M, SATO S. B lymphocytes and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17(6): 746-751.

GABBIANI G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; 200: 500-503.

GILMOUR TK, WILKINSON B, BREIT SN et al. Analysis of dendritic cell populations using a revised histological staging of morphea. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1183-1192.

GIUSTI B, SERRATI S, MARGHERI F et al. The antiangiogenic tissue kallikrein pattern of endothelial cells in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2005 ; 52(11) : 3618-3628.

GRANEL B, CHEVILLARD C, DESSEIN A. Facteurs de prédisposition génétiques à la fibrose au cours de la sclérodémie systémique. *La revue de médecine interne* 2005; 26: 294-303.

GROTENDORST GR, RAHMENIE H, DUNCAN MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblasts proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2004; 18: 469-479.

GUPTA K, GUPTA P, WILD R et al. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: Effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis* 1999; 3(2):147-158.

HARRIS ML, ROSEN A. Autoimmunity on Scleroderma: The Origin, Pathogenic Role, and Clinical Significance of Autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15(6): 778-84.

HARTLAPP I, ABE R, SAEED RW et al. Fibrocytes induce angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J.* 2001; 15(12):2215-24.

HASEGAWA M, FUJIMOTO M, TAKEHARA K et al. Pathogenesis of systemic sclerosis: Altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* 2005; 39: 1-7.

HAUSTEIN UF. Systemic sclerosis - scleroderma. *Dermatology Online Journal* 2002; 8(1): 3.

HENAULT J, ROBITAILLE G, SENEAL JL et al. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 963-973.

HENAULT J, TREMBLAY M, CLEMENT I et al. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3265-3274.

HERRMANN K, HECKMANN M, KULOZIK M et al. Steady-state mRNA of collagens I, III, fibronectin, and collagenase in skin biopsies of systemic sclerosis patients. *J Invest Dermatol* 1991; 97(2): 219-222.

HUGO C. The thombospondin 1-TGF- $\beta$  axis in fibrctic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1241-1245.

IHN H, YAMANE K, KUBO M et al. Blockage of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 474-480.

IWANO M, PLIETH D, DANOFF TM et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110(3): 341-350.

JIMENEZ-HEFFERNAN JA, AGUILERA A, AROEIRA LS et al. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; 444(3): 247-256.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Tecidos Conjuntivos. In: *Histologia Básica*. 5 ed, Ed. Guanabara Koogan S.A., 1982:112-116.

KAHALEH MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 978-983.

KAHALEH MB. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 718-722.

KAWAKAMI T, IHN H, XU W et al. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 47-51.

KIKUCHI K, KADONO T, FURUE M et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 281-284.

KIKUCHI K, KUBO M, SATO S et al. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 973-979.

KIRCHMAN TT, PRIETO VG, SMOLLER BR. CD34 staining pattern distinguishes basal cell carcinoma from trichoepithelioma. *Arch Dermatol* 1994; 130(5): 589-592.

KIRK TZ, MARK ME, CHUA CC et al. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 1995; 270: 3423-3428.

KISSIN EY, KORN JH. Fibrosis in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29(2): 351-69.

KURODA K, SHINKAI H. Decorin and glycosaminoglycan synthesis in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289(8): 481-485.

KURODA K, SHINKAI H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 567-572.

LEROY EC, BLACK C, FLEISHMAJER R. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1998; 15: 202-205.

LEROY EC, MEDSGER Jr TA. Criteria for the Classification of Early Systemic Sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28: 1573-1576.

LEROY EC. Esclerose Sistêmica. In: Cecil Tratado de Medicina Interna. 20 ed., Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997: 1640-45.

LIAW L, BIRK DE, BALLAS CB et al. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest* 1998; 101(7): 1468-1478.

MACKO RF, GELBER AC, YOUNG BA et al. Increased circulating concentrations of the counteradhesive proteins SPARC and thrombospondin-1 in systemic sclerosis (scleroderma). Relationship to platelet and endothelial cell activation. *J Rheumatol* 2002; 29(12): 2565-2570.

MARGOSIO B, MARCHETTI D, VERGANI V et al. Thrombospondin-1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor-2. *Blood* 2003; 102(13):4399-4406.

MARKS RM, CZERNIECKI M, ANDREWS BS et al. The effects of scleroderma serum on human microvascular endothelial cells: induction of antibody-dependent cell-mediated cellular cytotoxicity. *Arthritis Rheum* 1988; 31:1524-1534.

MASI AT, RODNAN GP, MEDSGER TA et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590.

MATTILA L, AIROLA K, AHONEN M et al. Activation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 416-421.

MAYES MD, LACEY Jr JV, BEEBE-DIMMER J et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003; 48(8): 2246-2255.

MCNIFF JM, GLUSAC EJ, LAZOVA RZ et al. Morphea limited to the superficial reticular dermis: an underrecognized histologic phenomenon. *Am J Dermatopathol* 1999; 21(4): 315-319.

MORI L, BELLINI A, STACEY MA et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res* 2005; 304(1): 81-90.

MOTEGI K, HARADA K, PAZOUKI S et al. Evidence of a bi-phasic effect of thrombospondin on angiogenesis. *Histochem J* 2002; 34(8-9): 411-421.

NARVAEZ D, KANITAKIS J, FAURE M et al. Immunohistochemical Study of CD34-Positive Dendritic Cells of Human Dermis. *Am J Dermatopathol* 1996; 18(3): 283-288.

NEEDLEMAN BW, CHOI J, BURROWS-MEZU A et al. Secretion and binding of transforming growth factor beta by scleroderma and normal dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1990; 33:650-656.

NEMETH A, PENNEYS N. Factor XIIa is expressed by fibroblasts in fibrovascular tumors. *J Cutan Pathol* 1989; 16:266-271.

NICKOLOFF BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol* 1991, 127: 523-529.

NISHIJIMA C, HAYAKAWA I, MATSUSSHITA T et al. Autoantibody against metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(2): 357-363.

PILLING D, BUCKLEY CD, SALMON M et al. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol* 2003; 171: 5537-5546

POSTLETHWAITE AE, SHIGEMITSU H, KANANGAT S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 733-738.

QUAN TE, COWPER S, WU S et al. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:598-606.

RENAUDINEAU Y, REVELEN R, LEVY Y et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Clin Diag Lab Immunol* 1999; 6:156-160.

ROFSTAD EK, HENRIKSEN K, GALAPPATHI K et al. Antiangiogenic treatment with thrombospondin-1 enhances primary tumor radiation response and prevents growth of dormant pulmonary micrometastases after curative radiation therapy in human melanoma xenografts. *Cancer Res* 2003; 63(14): 4055-4061.

RONDA N, GATTI R, GIACOSA R et al. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1595-1601.

SAKAI K, SUMI Y, MURAMATSU H et al. Thrombospondin promotes fibroblast-mediated collagen gel contraction caused by activation of latent transforming growth factor beta-1. *J Dermatol Sci* 2003; 31(2): 99-109.

SALGADO MCF. Esclerose Sistêmica: estudo prospectivo da deposição de proteínas da matriz extracelular e acompanhamento clínico e laboratorial de pacientes tratados com colchicina e D-penicilamina. Tese (Doutorado em Medicina), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

SAPADIN AN, ESSER AC, FLEISCHMAJER R. Immunopathogenesis of Scleroderma – Evolving Concepts. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 2001; 68(4): 233 – 242.

SATO S, HASEGAWA M, FUJIMOTO M et al. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000; 165: 6635-6643.

SATO S, HAYAKAWA I, HASEGAWA M et al. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2003; 120(4): 542-547.

SCHMIDT M, SUN G, STACEY MA et al. Identification of Circulating Fibrocytes as Precursors of Bronchial Myofibroblasts in Asthma. *J Immunol* 2003; 170: 380-389.

SERINI G, GABBIANI G. Mechanisms of myofibroblast activity activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999; 250: 273-283.

SGONC R, GRUSCHWITZ MS, BOECK G et al. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2550-2562.

SKOBIERANDA K, HELM KF. Decreased expression of the human progenitor cell antigen (CD34) in morphea. *Am J Dermatopathol* 1995; 17: 471- 475.

SMITH RS, SMITH TJ, BLIEDEN TM et al. Fibroblasts as sentinel cells. *Am J Pathol* 1997; 151(2): 317-322.

TAKEDA K, HATAMOCHI A, UEKI H et al. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 359-363.

TAMBY MC, CHANSEAUD Y, GUILLEVIN L et al. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2003; 2:152-157.

TELLECHEA O, REIS JP, ILHEU O, BAPTISTA AP. Dermal cylindroma. Na immunohistochemical study of thirteen cases. *Am J Dermatopathol* 1995; 17(3): 260-265.

TROSTLE DC, BEDETTI CD, STEEN VD et al. Renal vascular histology and morphometry in systemic sclerosis. A case-control autopsy study. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3):393-400.

VARGA J, ROSENBLOOM J, JIMENEZ S. Transforming growth factor beta causes a persistent increase in steady state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 1987; 247:597-604.

VUORIO T, MAKELA JK, VUORIO E. Activation of type I collagen genes in cultured scleroderma fibroblasts. *J Cell Biochem* 1985; 28(2):105-113.

WERNER S, GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835-837.

YAMAKAGE A, KIKUCHI K, SMITH EA et al. Selective upregulation of PDGF receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med* 1992; 175: 1227-1234.

YAMAMOTO N, NISHIOKA S, SASAI Y. Polarization microscopic investigation of collagen and acid glycosaminoglycans in the skin of progressive systemic sclerosis. *Acta Histochem* 1995; 97(2): 195-202.

YANG L, SCOTT PG, GIUFFRE J et al. Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and qualification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Lab Invest* 2002; 82(9): 1183-1192.

YAZAWA N, KIKUCHI K, HIRONUBO J et al. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42(Pt1): 70-75.

YOUNG-MIN SA, BEETON C, LAUGHTON R et al. Serum TIMP-1, TIMP-2 and MMP-1 in patients with systemic sclerosis, primary Raynaud's phenomenon, and in normal controls. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 846-851.

ZHANG J, ITO R, OUE N et al. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442(6): 563-568.

ZHOU X, TAN FK, XIONG M et al. Monozygotic twin clinically discordant for scleroderma show concordance for fibroblast gene expression profiles. *Arthritis Rheum* 2005; 52(10): 3305-3314.

## ANEXO 1

---

### DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TÍTULO DO ESTUDO:

QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD34 POSITIVAS NA PELE DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

#### OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é estudar a pele de pacientes com Esclerodermia, uma doença de causa ainda desconhecida, comparando-a com a pele de pacientes com pele normal. Acreditamos que com o estudo da pele com Esclerodermia poderemos entender melhor os mecanismos que produzem esta doença e assim desenvolver, num futuro breve, tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais.

#### PROCEDIMENTOS

Os pacientes portadores de Esclerodermia serão atendidos pelos médicos do Ambulatório de Dermatologia, que irão lhe informar sobre a biópsia de pele. A biópsia é a retirada de pequeno fragmento da pele. A biópsia é um método de exame simples para podermos confirmar o seu diagnóstico e estudar as alterações presentes na sua pele.

A biópsia é realizada com os seguintes passos: 1. Limpeza com álcool; 2. Injeção superficial na pele com anestesia 1 ml (proporcional a 20 gotas); 3. Retirada de 2 pequenos pedaços da pele de 4mm; 4. sutura com fio de nylon (pontos) e 5. Curativo com esparadrapo. Os pontos são retirados em 7-10 dias. E no local pode ficar uma cicatriz, geralmente menor que o tamanho da biópsia

Para os doadores de pele normal será realizado o mesmo procedimento.

Para os doadores de pele normal obtida de cirurgia não será retirada pele especificamente para utilização no estudo. O seu cirurgião só retirará a pele que for necessária para melhor resultado estético e doará um pequeno fragmento de aproximadamente 4mm para o estudo.

#### DESCONFORTOS E RISCOS

Da biópsia:

1. Uso de esparadrapo no local
2. Pequena cicatriz

Da doação da pele obtida de cirurgia:

Serão somente os da cirurgia, sem riscos ou desconfortos adicionais.

#### POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Você estará ajudando os pesquisadores a compreender melhor uma doença, o que pode resultar, no futuro, no desenvolvimento de novos remédios para o tratamento de pessoas com esta doença.

#### ORIENTAÇÕES GERAIS

Você não é obrigado a participar deste estudo. Você pode recusar participar dele e até mesmo deixá-lo a qualquer momento, sem ter que fornecer as razões para tanto. Sua decisão não afetará seu direito a assistência médica.

Embora sua participação neste estudo seja voluntária, você deverá seguir as instruções de seu médico enquanto estiver participando dele.

O pesquisador dermatologista estará a sua disposição para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante o período de estudo. Você pode se comunicar com seu médico assistente, Dra. Ana Paula de Sá Earp, pelos telefones 25125009 ou 96087854; ou com a Dra. Sueli Carneiro pelo telefone 25622580 para qualquer esclarecimento.

As informações pessoais obtidas a seu respeito durante o estudo permanecerão confidenciais.

Se você decidir participar, será necessário um consentimento por escrito.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Li o documento de consentimento livre e esclarecido para este estudo. Recebi as informações necessárias sobre a natureza, proposta e riscos do procedimento e o que será esperado de mim. Minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas.

Concordo em participar deste estudo. Concordo em cooperar totalmente com o médico e irei contactá-lo imediatamente se apresentar qualquer sintoma inesperado ou incomum. Antes e durante o período do estudo, notificarei ao médico sobre qualquer outro tratamento que esteja recebendo ou a que tenha sido submetido.

Informei ao médico sobre todas as doenças e medicamentos anteriores ou atuais e sobre qualquer consulta com outro médico nos últimos três meses.

Estou ciente de que, para minha própria segurança, deverei cooperar totalmente com os pedidos e orientações do meu médico.

A minha participação neste estudo é voluntária, podendo recusar em participar ou retirar-me do estudo a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais tenha direito.

Concordo que os resultados do estudo podem ser comunicados à comunidade científica e publicados em revistas médicas, mantendo em sigilo o meu nome e o meu endereço.

Autorizo comitês de ética, autoridades reguladoras locais ou estrangeiras, a examinarem, se assim o desejarem, estes registros médicos para confirmação das informações coletadas.

Nome do paciente \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ data \_\_\_\_\_

Médico \_\_\_\_\_

Eu confirmo haver pessoalmente explicado, para o indivíduo acima identificado, a natureza, o propósito e os riscos do procedimento.

Assinatura \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)