



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

Adriana Fontes Zimmermann

**INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS E ENVOLVIMENTO  
PULMONAR INTERSTICIAL NA ESCLEROSE SISTÊMICA:  
ASSOCIAÇÃO COM ALTERAÇÕES ESOFÁGICAS E  
MICROASPIRAÇÃO**

**FLORIANÓPOLIS**

**2012**



**Adriana Fontes Zimmermann**

**INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS E ENVOLVIMENTO  
PULMONAR INTERSTICIAL NA ESCLEROSE SISTÊMICA:  
ASSOCIAÇÃO COM ALTERAÇÕES ESOFÁGICAS E  
MICROASPIRAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina, como requisito para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Investigação Clínica.

Orientadora: Dra. Marcia M. M. Pizzichini

Co-Orientador: Dr. Emilio Pizzichini

Linha de Pesquisa: Doenças do Adulto:  
Investigação de Aspectos Clínicos e  
Epidemiológicos

**FLORIANÓPOLIS**

**2012**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zimmermann, Adriana Fontes

Inflamação das vias aéreas e envolvimento pulmonar intersticial na esclerose sistêmica [tese] : Associação com alterações esofágicas e microaspiração / Adriana Fontes Zimmermann ; orientadora, Marcia Margaret Menezes Pizzichini ; co-orientador, Emilio Pizzichini. - Florianópolis, SC, 2012.

116 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Esclerose sistêmica. 3. Pneumopatias intersticiais. 4. Inflamação das vias aéreas. 5. Refluxo gastroesofágico. I. Pizzichini, Marcia Margaret Menezes. II. Pizzichini, Emilio. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. IV. Título.





*À minha Mãe, Maria Eunice, cuja capacidade de compreensão e amor à vida nunca cessam de me surpreender.*



## AGRADECIMENTOS

*Aos orientadores, Profa. Marcia Pizzichini e Prof. Emilio Pizzichini, por terem acreditado na idéia do trabalho e em que eu conseguiria levá-lo a termo; obrigada também pela disposição em mergulhar no universo do conhecimento sobre uma doença tão complexa quanto misteriosa;*

*Ao meu marido Rubens e minha filha Laís, que abriram mão de minha companhia em muitos momentos durante esta jornada, compartilharam minhas angústias e me apoiaram incondicionalmente;*

*Aos Drs. Ricardo Malinverni, Osni E. Regis, Eduardo Usuy e Paulo de Miranda Gomes Filho, que por meio da realização dos exames tornaram possível este trabalho; e à Dra. Leila John Marques Steidle, que desde o início acreditou no projeto e contribuiu para enriquece-lo;*

*Ao Dr. Luiz Felipe Nobre, pelas discussões produtivas, idéias e ensinamentos na fascinante área da Radiologia e ao Dr. Ademar Paes Filho, pela disponibilidade e entusiasmo em participar do estudo;*

*Aos meus queridos colegas Reumatologistas, Drs. Ivânio Alves Pereira, Glaucio Ricardo Werner de Castro e Giovana Gomes Ribeiro, que me confiaram seus pacientes para compor esta casuística e sempre me incentivaram; e à Dra. Juliane Aline Paupitz, que me auxiliou no atendimento aos pacientes;*

*Às Enfermeiras Cristiane Cinara Rocha e Maíra Chiaradia Perraro, à Técnica de Laboratório Célia Tânia Zimmermann, e à Farmacêutica-Bioquímica Jéssica Gonçalves, que com seu profissionalismo e disponibilidade em muito contribuíram para que estes resultados se concretizassem;*

*E, finalmente, e não menos importante, aos pacientes que compuseram esta casuística e que se dispuseram a colaborar generosamente para a realização deste estudo. Eles são o objetivo e a motivação maior para todos os esforços feitos ao longo deste caminho.*



***“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.  
A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”  
(Atribuído a Hipócrates, século IV A.C.)***



## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O envolvimento pulmonar na Esclerose Sistêmica (ES) tem sido associado com refluxo gastroesofágico (RGE) causado por dismotilidade esofágica e microaspiração. Entretanto, a microaspiração ainda não foi objetivamente demonstrada. Nós objetivamos demonstrar, em pacientes com ES, a ocorrência de microaspiração e investigar sua associação com o envolvimento intersticial pulmonar e das vias aéreas e as anormalidades esofágicas.

**MÉTODOS:** Quarenta e sete pacientes com ES e 38 controles pareados por idade foram incluídos no estudo. Todos foram submetidos a indução do escarro, espirometria e teste de broncoprovocação com metacolina. Os pacientes também realizaram pletismografia e tomografia de tórax de alta resolução (TCAR), a qual foi analisada de acordo com um escore tomográfico (Índice Tomográfico, IT), monitoramento do pH esofágico de 24 horas e esofagomanometria. O índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido foi usado como método para aferir a microaspiração.

**RESULTADOS:** O grupo dos pacientes constituiu-se de 91,5% de mulheres, com idade média (DP) de 49,3 (11,8) anos e média (DP) de duração de doença de 8,1(7,4) anos, 68,1% deles com a forma limitada da doença. Anormalidades manométricas esofágicas foram encontradas em 78,7% dos pacientes e 70,2% deles tinha RGE patológico. Cinquenta e um por cento dos casos apresentava envolvimento pulmonar intersticial ( $IT \geq 3$ ) e alterações à espirometria ocorreram em 48,9% deles (23,4% com defeito restritivo e 21,3% com defeito obstrutivo leve). Os níveis de DLCO (corrigidos pelo volume alveolar,  $DLCO/VA$ ) estavam reduzidos em 44,6% dos casos. Microaspiração ( $ILM \geq 7$ ) foi encontrada em 93,6% dos pacientes, sendo que 42,6% deles tinham microaspiração considerada significativa ( $ILM \geq 50$ ). Os pacientes apresentaram contagem celular total (CT) ( $p=0,007$ ), contagem de neutrófilos ( $p < 0,0001$ ) e de eosinófilos ( $p=0,008$ ) mais elevadas do que os controles. Houve uma correlação positiva entre o ILM e o percentual de neutrófilos ( $r=0,30$ ,  $p=0,04$ ) e entre o ILM e CT no escarro induzido ( $r=0,37$ ,  $p=0,006$ ). Os níveis médios de  $DLCO/VA$  apresentaram correlação inversa com o ILM ( $r=0,33$ ,  $p=0,02$ ) e tenderam a estar reduzidos nos pacientes com alterações à manometria e/ou RGE moderado a grave (envolvimento esofágico acentuado,  $p=0,05$ ). Estes pacientes com envolvimento esofágico acentuado apresentaram IT mais elevado ( $=0,03$ ). A contagem de neutrófilos foi mais elevada em pacientes com alterações à TCAR ( $p=0,04$ ), porém não foi encontrada

associação entre o ILM e o IT. Cerca de um terço (27,7%) dos pacientes apresentou hiperresponsividade das vias aéreas, o que não foi observado em nenhum dos controles ( $p < 0,0001$ ), sem associação com nenhuma outra característica clínica ou funcional.

**CONCLUSÃO:** Os pacientes com ES apresentaram evidências de microaspiração frequente e de inflamação das vias aéreas, entre os quais foi demonstrada associação. Microaspiração também foi associada com anormalidades esofágicas e alteração da função pulmonar. Pacientes com anormalidades à TCAR apresentaram mais frequentemente padrão de inflamação neutrofílica das vias aéreas. Estes resultados demonstram uma associação entre microaspiração e envolvimento pulmonar na ES.

**Palavras-chave:** esclerose sistêmica; doença intersticial pulmonar; inflamação das vias aéreas; índice lipídico de macrófagos; escarro induzido; hiperresponsividade das vias aéreas.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Pulmonary involvement has been associated with gastroesophageal reflux (GER) caused by esophageal dysmotility and probably microaspiration in patients with systemic sclerosis (SSc). However, microaspiration was not objectively demonstrated. We aimed to demonstrate the occurrence of microaspiration and to investigate its association with airways and pulmonary interstitial involvement and with esophageal abnormalities in SSc patients.

**METHODS:** We enrolled 47 SSc patients and 38 controls matched by age. They performed sputum induction, spirometry and methacholine bronchial provocation test. Patients also performed plethysmography, chest high resolution computed tomography (HRCT), scored according to a tomographic index (Tix), esophageal 24 hour pH monitoring and esophageal manometry. Lipid laden alveolar macrophage index (LLAM) in induced sputum was used to measure microaspiration.

**RESULTS:** Patients were 91,5% women, with mean (SD) age of 49,3 (11,8) years and mean disease duration of 8,1(7,4) years, 61,8% of them with limited disease subset. Esophageal manometry abnormalities were found in 78,7% of the patients and 70,2% of them had pathological GER. Fifty one percent of the cases presented with interstitial lesions on HRCT ( $Tix \geq 3$ ) and 44,6% of them had spirometric abnormalities (23,4% with restrictive defect and 21,3% with mild obstructive defect). DLCO (corrected by alveolar volume, DLCO/VA) levels were reduced in 48,9 % of the patients. Microaspiration ( $LLAM \geq 7$ ) was found in 93,6% of the patients and in 42,6% % of them it was considered severe ( $LLAM \geq 50$ ). Patients had higher sputum total cell (TCC) ( $p=0,007$ ), neutrophil ( $p < 0,001$ ) and eosinophil counts ( $p=0,008$ ) than controls. There was a positive correlation between LLAM and neutrophil count ( $r=0,30$ ,  $p=0,04$ ) and between LLAM and TCC ( $r=0,37$ ,  $p=0,006$ ). Mean DLCO/VA was negatively correlated with LLAM ( $r=-0,33$ ,  $p=0,02$ ) and tended to be lower in patients with manometry abnormalities and/or moderate to severe GER (severe esophageal involvement,  $p=0,05$ ). Those patients with severe esophageal involvement had higher Tix ( $p=0,03$ ). Neutrophils were higher in patients with HRCT lesions ( $p=0,04$ ), but no association was found between LLAM and Tix. About one third (27,7%) of the patients had airway hyperresponsiveness, compared with none of the controls ( $p < 0,0001$ ), which was not associated with any other clinical or functional characteristics.

**CONCLUSION:** In SSc patients, microaspiration and airways inflammation were both frequent and were associated with each other.

Microaspiration was also associated with esophageal abnormalities and abnormal pulmonary function. Patients with HRCT lesions had more frequently an airways inflammatory pattern. These results demonstrate an association between microaspiration and lung involvement in SSc.

Key words: systemic sclerosis; interstitial lung disease; airways inflammation; lipid laden alveolar macrophages; induced sputum; airways hyperresponsiveness.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais Mecanismos Fisiopatogênicos na Esclerose Sistêmica .....	34
Figura 2. Macrófago Alveolar com Inclusões Citoplasmáticas de Lipídios .....	58



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características demográficas e clínicas dos pacientes com ES (n=47) .....	63
Tabela 2.	Tratamento medicamentoso utilizado nos pacientes com ES (n=47) .....	64
Tabela 3.	Prevalência de sintomas digestivos e respiratórios nos pacientes com ES (n=47) .....	65
Tabela 4.	Anormalidades da manometria e da PHmetria esofágica nos pacientes com ES (n=47) .....	66
Tabela 5.	Resultados do escarro induzido de acordo com tabagismo prévio nos pacientes com ES (n=47) .....	68
Tabela 6.	Parâmetros funcionais pulmonares dos 47 pacientes com ES (n=47) e dos controles (n=38) .....	70
Tabela 7.	Anormalidades da função pulmonar dos pacientes com ES (n=47) .....	71
Tabela 8.	Alterações tomográficas nos pacientes com ES e envolvimento pulmonar à TCAR (n=24) .....	71
Tabela 9.	Anormalidades tomográficas em relação ao percentual de área pulmonar acometida nos pacientes com ES e envolvimento pulmonar à TCAR (n=24) .....	72
Tabela 10.	Características clínicas e funcionais dos pacientes com ES de acordo com a presença de anormalidades à TCAR (n=47) .....	73
Tabela 11.	Parâmetros funcionais e anatômicos (TCAR) pulmonares de acordo com a presença de envolvimento esofágico acentuado .....	74



## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Contagem Celular Total (CT) e percentual de neutrófilos e eosinófilos no escarro induzido dos pacientes com ES (n=47) e dos controles (n=38) ..... 67
- Gráfico 2. Índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido de acordo com a presença de apertose esofágica nos pacientes com ES (n=47) ..... 69
- Gráfico 3. Correlação entre a contagem celular total (CT) e o índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido dos pacientes com ES (n=47) ..... 75
- Gráfico 4. Correlação entre percentual de neutrófilos e índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido dos pacientes com ES (n=47) ..... 76
- Gráfico 5. Correlação entre o índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido e os níveis de DLCO nos pacientes com ES (n=47) ..... 76
- Gráfico 6. Contagem celular total (CT) e diferencial ( percentual de neutrófilos e de eosinófilos) do escarro induzido de acordo com a presença de anormalidades à TCAR nos pacientes com ES (n=47) ..... 77



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
ACA	Anticorpos Anti-centrômero
AF	Alveolite Fibrosante
ANA	Anticorpos Antinucleares
Anti-Sc170	Anticorpos Anti-Esclero70
AR	Artrite Reumatóide
BANK1	Proteína de Ancoragem de Célula B com repetições de Anquirina 1
c-Abl	Tirosinoquinase c-Abelson
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
CPT	Capacidade Pulmonar Total
CREST	Calcinose, Raynaud, Esôfago, Esclerodactilia, Telangiectasias
CTGF	Fator de Crescimento do Tecido Conectivo
CVF	Capacidade Vital Forçada
$D_{LCO/VA}$	Difusão de Monóxido de Carbono corrigida pelo Volume Alveolar
DMTC	Doença Mista do Tecido Conectivo
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DVAS	Disfunção das Vias Aéreas
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EGR	Gen de resposta de crescimento precoce
EIE	Esfíncter Inferior do Esôfago
ES	Esclerose Sistêmica

ERRC	Estimativa de Risco Relativo Combinado
ESE	Esfíncter Superior do Esôfago
EULAR	Liga Européia contra o Reumatismo
FPI	Fibrose Pulmonar Idiopática
HB	Hiperresponsividade Brônquica
HIF	Fator Induzido por Hipóxia
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HU	Hospital Universitário
IBP	Inibidores de Bomba Protônica
IL	Interleucina
ILM	Índice Lipídico de Macrófago
IL23R	Receptor da Interleucina 23
IRF5	Fator Regulador de Interferon Cinco
IT	Índice Tomográfico
LBA	Lavado Broncoalveolar
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MCP-1	Proteína-1 Quimioatrativa de Monócitos
MEC	Matriz Extra Celular
MEF25	Máximo Fluxo Expiratório a 25% da Capacidade Vital
MIF173	Fator de Inibição da Migração dos Macrófagos 173
NUPAIVA	Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas
PC <sub>20</sub>	Concentração Provocativa 20%
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PIU	Pneumonia Intersticial Usual
PINE	Pneumonia Intersticial Não Específica
PM	Polimiosite

POL3	Anti-RNA Polimerase III
PTPN22	Gen Não-Receptor 22 da Proteína Tirosina Fosfatase
RGE	Refluxo Gastroesofágico
RNP	Ribonucleoproteína
SS	Síndrome de Sjögren
STAT4	Gen da Transdução do Sinal e Ativação da Transcrição Quatro
TCAR	Tomografia de Tórax de Alta Resolução
TGF $\beta$	Fator de Crescimento Transformador $\beta$
TGI	Trato Gastrointestinal
TH	Linfócitos T Auxiliadores
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEF <sub>1</sub>	Volume Expiratório Final em um segundo
VF	Vidro Fosco
VR	Volume Residual



## SUMÁRIO

<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b> .....	<b>29</b>
1.1 Definição e breve histórico da ES .....	29
1.2 Epidemiologia e bases genéticas da Esclerose Sistêmica.....	29
1.2.1 Fatores ambientais .....	30
1.2.2 Fatores genéticos .....	31
1.3 Etiologia e fisiopatogênese da Esclerose Sistêmica .....	32
1.3.1 Disfunção vascular .....	33
1.3.2 Desregulação da imunidade inata e adaptativa .....	34
1.3.3 Ativação dos fibroblastos e produção da fibrose .....	35
1.4 Critérios de classificação da Esclerose Sistêmica .....	37
1.5 Formas clínicas e autoanticorpos específicos na Esclerose Sistêmica .....	38
1.6 Envolvimento do trato digestivo na Esclerose Sistêmica: manifestações esofágicas .....	39
1.7 Envolvimento pulmonar na Esclerose Sistêmica .....	41
1.8 Associação entre RGE, Aspiração e Envolvimento Pulmonar na Esclerose Sistêmica .....	47
1.9 Justificativa do Estudo .....	50
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
2.1 Objetivo geral .....	51
2.2 Objetivos específicos .....	51
<b>3. MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.1 Desenho e sujeitos do estudo .....	53
3.2 Local do estudo .....	54
3.3 Aspectos éticos .....	54
3.4 Medidas .....	54
3.4.1 Protocolo clínico e testes laboratoriais .....	54
3.4.2 Manometria esofágica .....	55
3.4.3 Monitoração do pH esofágico de 24 horas (pHmetria) .....	56
3.4.4 Indução e processamento do escarro .....	57
3.4.5 Teste de broncoprovocação com metacolina ....	59
3.4.6 Espirometria .....	59
3.4.7 Pletismografia Pulmonar e Difusão de Monóxido de Carbono .....	60

3.4.8 Tomografia Computadorizada de Tórax de Alta Resolução .....	60
3.5 Análise Estatística .....	61
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
4.1 Caracterização da amostra .....	63
4.2 Envolvimento esofágico: resultados da manometria e pHmetria .....	65
4.3 Comprometimento das vias aéreas: resultados do escarro induzido e do teste de broncoprovocação .....	66
4.4 Associação entre as alterações esofágicas e os resultados do escarro induzido .....	68
4.5 Envolvimento pulmonar: resultados das provas funcionais pulmonares .....	69
4.6 Envolvimento pulmonar intersticial: resultados da TCAR .....	71
4.7 Associações entre as anormalidades esofágicas, alterações da função pulmonar e da TCAR .....	74
4.8 Correlações entre a celularidade do escarro induzido e o índice lipídico de macrófagos e entre o índice lipídico de macrófagos e a função pulmonar .....	75
4.9 Associação entre as alterações tomográficas e os resultados do escarro induzido .....	77
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>6. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS .....</b>	<b>89</b>
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	111
ANEXO Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa .....	116

# 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

## 1.1 Definição e Breve Histórico da Esclerose Sistêmica

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença difusa do tecido conectivo de natureza autoimune e etiologia desconhecida, caracterizada primariamente pelo aumento de deposição de colágeno na matriz extracelular, a qual resulta em fibrose cutânea, presença de microvasculopatia e desenvolvimento de lesões fibróticas viscerais características em pulmões, trato gastrointestinal, coração e rins<sup>(1)</sup>.

O aspecto endurecido da pele que caracteriza a esclerose sistêmica tem chamado a atenção dos autores desde o século XIV, sendo o termo “escleroderma” cunhado por Fantonetti em 1838<sup>(2)</sup>. A primeira descrição detalhada da doença encontrada na literatura data de 1842, onde são relatadas duas formas clínicas da enfermidade, uma forma completa, com fibrose da pele e envolvimento multissistêmico e uma forma com envolvimento cutâneo limitado às extremidades e de prognóstico muito mais benigno<sup>(3)</sup>. Mais de 100 anos depois, em 1945, o termo “esclerose sistêmica progressiva” foi estabelecido, quando Robert H. Goetz reconheceu e enfatizou o caráter multissistêmico e evolutivo da doença<sup>(4)</sup>. Já a forma de ES limitada, até hoje conhecida como a sigla em inglês CREST (calcinose, raynaud, esôfago, esclerodactilia, telangiectasias), foi caracterizada no final dos anos 70<sup>(5)</sup>, enquanto que a atual denominação, ES, foi adotada a partir dos anos 80<sup>(1)</sup>.

## 1.2 Epidemiologia e bases genéticas da Esclerose Sistêmica

A ES é uma doença rara e fenotipicamente complexa e pleomórfica, o que torna difícil a obtenção de dados epidemiológicos fidedignos. Assim, dados referentes à incidência e prevalência da ES sofrem influência dos métodos de coleta dos dados, definição da doença e, naturalmente, da área geográfica considerada. Entretanto, estudo investigando a incidência da ES publicados na última década tem apresentado resultados bastante semelhantes, como aqueles realizados na Espanha, Austrália e Estados Unidos (Michigan), apontando que nessas regiões a incidência da ES situa-se em 23, 22.8 e 19.3 casos/milhão de pessoas/ano, respectivamente<sup>(6-7)</sup>.

Quanto à prevalência da doença, porém, são relatadas taxas bastante variáveis, desde 71 casos/milhão no Japão<sup>(8)</sup> e 88 casos/milhão

no noroeste da Inglaterra <sup>(9)</sup>, até 443 casos/milhão no Canadá (Quebec) <sup>(9)</sup>, passando por taxas também semelhantes como nos estudos mencionados acima, de 277, 233 e 242 casos/milhão na Espanha, Austrália e Detroit <sup>(6-7, 10)</sup>. Estes números revelam que, de modo geral, a prevalência da ES é mais elevada nos Estados Unidos da América e Austrália do que no Japão e no norte da Europa.

A maior prevalência conhecida de ES em uma região e grupo étnico é em uma tribo de indígenas Choctaws residente em Oklahoma, EUA, que é de 469 casos/100.000 pessoas em indivíduos não miscigenados, os quais apresentavam em sua maioria formas difusas graves, com anticorpo anti-topoisomerase (ScI70) positivo <sup>(11)</sup>. Um estudo nesse grupo mostrou a presença do gene da fibrilina 1, no cromossomo 15, que foi associado com a susceptibilidade à ES nesse grupo <sup>(12)</sup>. Outros locais com grande número de casos da doença foram relatados, como em Edenhope, Austrália, (610 casos/milhão) onde se suspeita que fatores ambientais regionais possam estar envolvidos <sup>(13)</sup>. Com relação à importante influência étnica na prevalência e gravidade da ES, além da alta prevalência de ES nos índios Choctaws, estudos tem sugerido que a doença é mais frequente em mulheres da raça negra quando comparadas com mulheres caucasianas. Neste grupo étnico, conforme o estudo feito em Michigan, a ES foi mais prevalente em negros e a forma difusa foi mais frequente nas mulheres afroamericanas <sup>(7)</sup>.

### **1.2.1. Fatores ambientais**

Desde a década de 1950, fatores de risco ambientais tem sido implicados no desenvolvimento da ES. As associações mais importantes estão relacionadas à exposição à sílica e aos solventes orgânicos. A estimativa de risco relativo combinado (ERRC) para a sílica, calculada em uma metanálise, foi de 3.20 (IC 95% 1.89–5.43) para os homens. Em relação à exposição a solventes orgânicos, a ERRC encontrada em uma metanálise foi de 2.91 (IC 95%: 1.60, 5.30) <sup>(14)</sup> e, segundo outra metanálise mais recente <sup>(15)</sup> esse último é um fator associado ao risco aumentado de ES em homens. Em mulheres, têm sido apontados como possíveis fatores ambientais ocupacionais o trabalho em indústria têxtil e em educação <sup>(16-17)</sup> também relacionados a agentes inalados.

### 1.2.2. Fatores genéticos

Quanto à susceptibilidade genética à ES, polimorfismos do sistema principal de histocompatibilidade (antígenos leucocitários humanos, HLA) tem sido ligados ao desenvolvimento da doença <sup>(18)</sup>. As principais associações são com os antígenos HLA de classe II. Um recente grande estudo mostrou a associação positiva dos haplótipos HLA-DRB1\_1104, DQA1\_0501, DQB1\_0301 e, ao contrário, o fator protetor dos haplótipos HLA-DRB1\_0701, DQA1\_0201, DQB1\_0202 e DRB1\_1501 em brancos e hispânicos com ES, enquanto em negros a associação foi com os alelos HLA-DRB1\_0804, DQA1\_0501, e DQB1\_0301 <sup>(19)</sup>.

Além disso, o sistema HLA também tem sido estudado em sua associação com a especificidade dos autoanticorpos na ES. Este mesmo estudo revelou a associação dos anticorpos anti-Sc170 com os antígenos HLADPB1\_1301 e dos anticorpos anti-centrômero (ACA) com os HLADQB1\_0501 e DQB1\_26 e dos anticorpos anti-RNA polimerase com os alelos HLA-DRB1\_0404, DRB1\_11 e DQB1\_03, o que ilustra as múltiplas influências que este sistema gênico pode exercer sobre a doença e seu perfil clínico e imunológico <sup>(19)</sup>.

Muitos outros genes tem sido implicados na susceptibilidade à ES, em sua grande maioria genes codificadores de proteínas responsáveis pela regulação e transdução de sinais que compõem os mecanismos de autoimunidade e inflamação envolvidos na patogênese da ES. Uma das principais associações encontradas foi com o gene codificador da transdução do sinal e ativação da transcrição quatro (STAT4) <sup>(20-23)</sup>, que promove a diferenciação dos linfócitos auxiliares (TH1) e regulam negativamente os TH2. Também foi confirmada a associação com a proteína de ancoragem de célula B com repetições de anquirina (BANK1), a qual liga o receptor da célula B às proteínas de sinalização intracelular, como às quinases <sup>(24)</sup> e com o fator regulador de interferon cinco (IRF-5), regulador da transcrição de genes do interferon tipo I <sup>(25-26)</sup>. Além disso, foram também relatadas associações positivas com a ES dos genes candidatos ao receptor da interleucina (IL) 23 (IL23R), envolvido na expressão da interleucina IL23, citocina que expande a população de linfócitos TH17 e associado apenas a ES com presença de anti-Sc170 e hipertensão pulmonar <sup>(27)</sup>, e fator de crescimento derivado do tecido conectivo (CTGF), que induz proliferação celular, produção de matriz extracelular (MEC) e quimiotaxia de células mesenquimais <sup>(28-29)</sup>.

Recentemente se descobriu que interações entre os genes também são importantes, como o aparente efeito aditivo exercido pela presença simultânea do STAT4, IRF-5 e BANK1 na susceptibilidade e desenvolvimento de forma clínica difusa e fibrose pulmonar <sup>(21, 30)</sup>. Outra descoberta interessante foi o compartilhamento de fatores de risco genéticos entre diferentes doenças autoimunes, bem exemplificado pelo gene não-receptor 22 da proteína tirosina fosfatase (PTPN22), implicado na susceptibilidade à ES <sup>(31-32)</sup>, assim como ao diabetes melito tipo I <sup>(33)</sup>, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatóide (AR) <sup>(34)</sup>. Outros genes, como o BANK1, IRF5 e STAT4 também foram implicados como envolvidos na susceptibilidade ao LES e à AR <sup>(35-38)</sup>.

Muito recentemente, foi demonstrado em populações europeias caucasianas <sup>(39)</sup> a influência do fator de inibição da migração dos macrófagos 173 (MIF-173), uma citocina com funções imunorregulatórias e mediadora da imunidade inata e adaptativa, que tem sido implicada na patogênese da vasculopatia da ES e cujos níveis foram encontrados elevados nos pacientes esclerodérmicos, especialmente na forma difusa da doença <sup>(40-41)</sup>.

### **1.3 Etiologia e fisiopatogênese da Esclerose Sistêmica**

A etiologia da ES permanece desconhecida. Sabe-se que, como na grande maioria das doenças autoimunes, a mesma é o resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais <sup>(42)</sup>. No entanto, os mecanismos que desencadeiam a doença no indivíduo geneticamente susceptível ainda não foram elucidados. Diversos fatores tem sido implicados, como as exposições a agentes infecciosos, principalmente os vírus. Destes, o vírus Epstein-Barr, citomegalovirus e parvovirus B19 são exemplos de infecções prevalentes em pacientes com ES ou contra os quais a imunidade adaptativa específica desses pacientes seria defeituosa e que portanto poderiam representar estímulos ao desenvolvimento da doença <sup>(43-46)</sup>.

Atualmente considera-se que o processo fisiopatogênico da ES decorre de uma complexa interrelação entre três componentes principais: (1) a disfunção vascular, que resulta na vasculopatia proliferativa; (2) a desregulação da imunidade inata e adaptativa, representada principalmente pelas alterações do sistema imune humoral e celular e (3) o excesso de ativação dos fibroblastos e células afins, gerando a fibrose que caracteriza a doença <sup>(47)</sup> (Figura 1).

### 1.3.1 Disfunção vascular

A ocorrência do fenômeno de Raynaud em quase todos os pacientes com ES demonstra a importância da vasculopatia no contexto patogênico da doença. Acredita-se que a lesão vascular possa se originar da injúria endotelial por fatores desconhecidos e consequente ativação das células endoteliais, além de apoptose excessiva de células endoteliais <sup>(48)</sup>. Diversos estudos detectaram níveis plasmáticos elevados e aumento de expressão de fator de Von Willebrand, moléculas de adesão intercelular, endotelina-1 e trombospondina <sup>(49-51)</sup>. A lesão endotelial crônica resulta em adesão plaquetária e ativação do sistema fibrinolítico, aumento da permeabilidade vascular e adesão leucocitária à parede vascular <sup>(50)</sup>.

O aumento dos níveis de endotelina-1, um potente vasoconstritor, foi detectado no plasma e no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com ES. Esta proteína é responsável por aumentar a adesão leucocitária ao endotélio, promover a migração e proliferação de células musculares lisas para a camada íntima e ativar os fibroblastos. Esse processo promove a síntese e deposição de moléculas da matriz extracelular levando à fibrose com perda da elasticidade e redução progressiva do lúmen vascular <sup>(52-53)</sup>.

A hipóxia tecidual promove a angiogênese (formação de novos vasos a partir de vasos funcionais remanescentes) e a vasculogênese (formação de novos vasos gerados a partir de células endoteliais progenitoras) <sup>(55)</sup>, na tentativa de restaurar o aporte celular de oxigênio. Estes processos são deficitários na ES, ocorrendo um desequilíbrio entre fatores angiogênicos e angiostáticos e ineficácia do reparo vascular <sup>(56-57)</sup>. Formam-se capilares morfológicamente aberrantes e disfuncionais, que podem ser visualizados à capilaroscopia periungueal. A hipóxia tecidual exerce um importante papel patogênico na ES. A produção do fator induzido por hipóxia (HIF-1) apresenta produção e regulação deficitárias, falhando em restabelecer níveis tensionais normais de oxigênio. Essa deficiência gera um círculo vicioso, com aumento da ativação das células do sistema imune, aumento da ativação dos fibroblastos e deposição de MEC, que por sua vez agravam o ambiente hipóxico. Além disso, o aumento do estresse oxidativo gerado pela hipóxia tem efeito pró-inflamatório e profibrótico, exercido pelos espécimes reativos de oxigênio <sup>(58)</sup>.



mediadores representam o elo de ligação entre a vasculopatia e a fibrose tecidual, já que estão envolvidos em ambos os processos <sup>(54)</sup>.

Os linfócitos B formam infiltrados na pele de pacientes com ES, detectados por meio de DNA “*microarray*” <sup>(59)</sup> e expressam marcadores de ativação crônica dos mesmos (CD19, CD85) <sup>(60)</sup>. A produção de autoanticorpos, que representam uma marca registrada da doença e caracterizam suas formas clínicas, é a expressão mais evidente do envolvimento do sistema imune humoral. Os principais autoanticorpos cujo potencial patogênico está estabelecido são, além dos ACA e anti-Sc170, autoanticorpos específicos contra células endoteliais e contra o receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) <sup>(54)</sup>.

Já o papel patogênico dos linfócitos T na ES é evidenciado pelo aumento da transmigração endotelial de células T CD4+ advinda dos infiltrados inflamatórios perivasculares e da ativação oligoclonal dessas células, com produção de citocinas profibróticas <sup>(61)</sup>. A produção predominante destas citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e proteína-1 quimioatrativa de monócitos ou MCP-1) resulta do desequilíbrio entre os perfis de células TH1 e são derivadas de células TH2, perfil que predomina na ES e que promovem agravamento da fibrose tecidual <sup>(62)</sup>. No entanto, a importância da inflamação e da autoimunidade na patogênese da ES parece estar relacionada a fenômenos órgão específicos, sendo por exemplo, mais relevantes no desenvolvimento da fibrose pulmonar do que da cutânea <sup>(63)</sup>.

### **1.3.3. Ativação dos fibroblastos e produção da fibrose**

O terceiro mecanismo patogênico envolvido na ES e o mais representativo da doença é a fibrose, que dá nome à doença e acomete a pele, os pulmões, o coração, o trato digestivo, o sistema musculoesquelético e a rede vascular e está associada diretamente com a morbimortalidade dos pacientes. A fibrose resulta da complexa interação entre múltiplos processos simultâneos ou em cascata, nos quais estão presentes dezenas de mediadores celulares, citocinas e seus receptores, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de sinalização intracelular. O resultado dessa interação é a produção excessiva e o acúmulo nos tecidos de material insolúvel que compõe a MEC. Estão presentes os colágenos fibrilares tipo I e II, colágeno tipo VII, fibrilas elastina e fibrilina <sup>(55)</sup>.

O fibroblasto é a célula que é essencialmente responsável pela produção e remodelamento da MEC e tem sua importância fisiológica

principal no processo de cicatrização de lesões do tecido conectivo. Na ES o fibroblasto encontra-se permanentemente hiperativado, expressando genes que determinam produção exagerada de MEC e interferem com a sua autorregulação normal <sup>(54)</sup>. Os miofibroblastos, células contráteis produtoras de MEC e que ocorrem transitoriamente no tecido de granulação, originam-se a partir de transdiferenciação de fibroblastos, células epiteliais e pericitos. As mesmas produzem fibrose na ES ao se tornarem permanentes <sup>(64-65)</sup>. Aumento dos fibrócitos, precursores dos fibroblastos liberados pela medula óssea, também contribui para o incremento do montante de células profibróticas, tanto na pele <sup>(66)</sup> quanto nos pulmões <sup>(67)</sup> de pacientes com ES.

As principais proteínas efetoras envolvidas nos mecanismos de fibrose na ES são citocinas, quimiocinas e a família dos fatores de crescimento da MEC, as quais induzem resposta celular fibrogênica<sup>(56)</sup>. As citocinas profibróticas desempenham um papel patogênico na ES. A IL-4 estimula a síntese de fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e do fator de crescimento derivado do tecido conectivo (CTGF), além de promover a migração, proliferação e síntese de colágeno pelos fibroblastos <sup>(68-70)</sup>. A IL-13 induz a expressão do gene do colágeno tipo I e seus níveis estão elevados em pacientes com ES <sup>(69, 71)</sup>. Além disso, a MCP-1, que estimula diretamente a produção de colágeno e induz também maior incremento na produção do mesmo por meio do TGF $\beta$  e da IL-4, foi encontrada em maiores níveis em pacientes com ES, sendo que sua quantidade se correlacionou com a extensão do envolvimento pulmonar na doença <sup>(72-73)</sup>.

O TGF $\beta$  é considerado o orquestrador do processo de reparo tecidual, tanto fisiológico como patológico, com produção de fibrose. O TGF $\beta$  é produzido por fibroblastos, células T, monócitos e plaquetas e liberado como um complexo latente que é ativado pela lesão tecidual à sua forma biologicamente ativa no interior da MEC e exerce sua função por meio da ligação com o receptor específico (TGF $\beta$ RII) na superfície de diversos tipos de células <sup>(53)</sup>. A partir dessa ligação, inicia-se uma cascata de sinalização intracelular que resulta na expressão dos genes alvo. O principal controle da sinalização do TGF $\beta$  é exercido pelo sistema SMAD (os ativadores SMAD2, SMAD3 e o inibidor endógeno SMAD7 e seus cofatores), cuja desregulação foi demonstrada na ES <sup>(74-75)</sup>. Outro mecanismos regulatório do TGF $\beta$  envolvido na ES é a c-Abl quinase (c-Abelson tirosinoquinase) <sup>(76)</sup> cujo inibidor, o imatinib, reduz as respostas fibróticas em modelos animais e tem apresentado resultados positivos no tratamento de alguns pacientes com ES <sup>(77-78)</sup>. No entanto, seu papel terapêutico na doença ainda não está estabelecido. O EGR-1,

gene de resposta de crescimento precoce, também pode ser importante como mediador da resposta celular profibrótica ao TGF $\beta$ , conforme demonstrado em modelo murino de esclerodermia induzida por bleomicina<sup>(79)</sup>.

Outros fatores de crescimento são importantes na fisiopatogênese da ES, como o CTGF, que tem efeitos muito similares aos do TGF $\beta$ . Sua expressão é estimulada pelo próprio TGF $\beta$ , pela hipóxia e pela endotelina-1.<sup>(53)</sup> O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é produzido por fibroblastos, plaquetas, macrófagos e células endoteliais, com importante ação mitótica e quimioatrativa para fibroblastos, induzindo a produção pelos mesmos de colágeno, fibronectina e proteoglicanos e a liberação dos mediadores profibróticos IL-6 e MCP-1. Também apresenta interação com TGF $\beta$  e CTGF e foi detectado em níveis elevados nos pulmões de pacientes com ES<sup>(80)</sup>.

#### 1.4 Critérios de Classificação da Esclerose Sistêmica

O Colégio Americano de Reumatologia (ACR) desenvolveu na década de 1970 os primeiros critérios de classificação para a ES. O critério maior e obrigatório é a fibrose cutânea distal às articulações metacarpofalangeanas. Os critérios menores, dos quais pelo menos dois devem estar presentes, são as cicatrizes em polpas digitais, esclerodactilia e fibrose pulmonar bibasilar<sup>(81)</sup>. Como estes critérios excluía muitos pacientes com a forma limitada, os mesmos foram modificados em 2001<sup>(82)</sup>, porém os critérios do ACR continuam válidos e vem sendo ainda adotados nos estudos clínicos.

A classificação da ES atualmente utilizada inclui duas formas clínicas principais. Na *forma limitada*, o envolvimento cutâneo inclui a face e as extremidades, não ultrapassando os cotovelos e os joelhos, já na *forma difusa* a fibrose envolve também o tórax e o abdômen. Além disso, hoje é também reconhecida uma forma da doença, chamada de “*sine scleroderma*”, em que não ocorre o envolvimento da pele, porém estão presentes autoanticorpos e acometimento visceral característicos da ES<sup>(83)</sup>.

Considerando a grande heterogeneidade clínica da doença, não contemplada pelos critérios existentes, uma iniciativa conjunta do ACR e da EULAR (Liga Européia Contra o Reumatismo) propôs novos critérios de classificação da ES<sup>(84)</sup>. O principal objetivo dessa iniciativa<sup>(85)</sup> é possibilitar o diagnóstico precoce da doença, incorporando os avanços científicos ocorridos nas últimas décadas, especialmente a identificação de novos autoanticorpos e o método de avaliação da

microvasculopatia por meio da capilaroscopia periungueal. Estudos de validação destes critérios estão em andamento <sup>(86)</sup>.

### **1.5 Formas Clínicas e Autoanticorpos Específicos na Esclerose Sistêmica**

A ES apresenta autoanticorpos específicos, que se associam a subgrupos distintos dentro do espectro da doença, com diferentes padrões clínicos e prognósticos. De modo geral, estes anticorpos são mutuamente excludentes (é rara a sua presença concomitante) e os mesmos não costumam alterar sua especificidade no decorrer da doença <sup>(87)</sup>.

A principal categoria de autoanticorpos presentes nos pacientes com ES limitada são os ACA <sup>(88)</sup>, que além das manifestações clínicas descritas acima ocorrem em geral em indivíduos mais idosos, do gênero feminino e com menor proporção de negros. A ES limitada é de modo geral mais benigna, porém está associada ao desenvolvimento tardio de hipertensão arterial pulmonar (HAP), a complicação mais grave da doença. Na maior parte dos casos os pacientes apresentam fenômeno de Raynaud por muitos anos antes de desenvolverem edema de mãos e úlceras digitais <sup>(89)</sup>. Envolvimento gastrointestinal é muito prevalente e tem elevada morbidade <sup>(90)</sup>. Nestes pacientes o envolvimento cardíaco é mais frequente do que reconhecido clinicamente, sendo importante fator de morbimortalidade <sup>(91)</sup>. HAP tardia ocorre neste subgrupo em cerca de 20% dos pacientes e apresenta altíssimas taxas de mortalidade <sup>(92)</sup>. Alternativamente, pacientes com ES limitada podem apresentar outros três tipos de auto anticorpos. Os anticorpos anti-Th/To, que são mais frequentes em homens, com envolvimento pulmonar intersticial ou vascular e mortalidade mais precoce e raramente forma difusa <sup>(93-94)</sup>. O anticorpo anti PM/Scl, que associa-se com a presença de miosite, calcinose, acro-osteólise e pneumopatia intersticial, sendo que cerca de vinte por cento dos pacientes pode ter a forma difusa <sup>(95)</sup>. O anti-U1RNP, quando presente em altos títulos caracteriza a chamada doença mista do tecido conectivo (DMTC), uma superposição entre ES, LES e miosite <sup>(96)</sup>.

Na forma difusa da ES, a qual é mais frequentemente associada aos anticorpos anti-Scl70, os pacientes em geral desenvolvem precocemente envolvimento pulmonar intersticial progressivo e apresentam maior risco de crise renal, especialmente nos primeiros anos de doença. Complicações musculoesqueléticas como contraturas em flexão dos dedos das mãos são comuns e muito incapacitantes <sup>(89)</sup>. Mais

raramente, ocorrem na forma difusa os anticorpos anti-RNA polimerase III (POL3), cujos portadores tem alta frequência de crise renal, fibrose cutânea rapidamente progressiva e pouco envolvimento gastrointestinal e pulmonar <sup>(97-98)</sup>. A forma difusa ainda pode apresentar anticorpos anti U3RNP, que é o mais frequente em negros e tem pior prognóstico, com fibrose pulmonar grave, HAP, alterações de pigmentação e contraturas articulares. <sup>(99-100)</sup>.

### **1.6 Envolvimento do trato digestivo na Esclerose Sistêmica: manifestações esofágicas**

O acometimento visceral mais comum na ES é o do trato gastrointestinal (TGI), que ocorre em 75 a 90% dos casos, em qualquer das formas clínicas <sup>(101)</sup>. Do ponto de vista fisiopatogênico, o evento primário que acontece em todo o TGI parece ser a isquemia ocasionada pela vasculopatia do *vasa nervorum* que leva a uma lesão do plexo mioentérico, o qual também pode ser comprimido pelo excesso de colágeno depositado ou lesado secundariamente à inflamação. A camada muscular circular é mais afetada do que a longitudinal e o envolvimento é inicialmente segmentar, porém tende a se difundir, com a fusão das áreas afetadas. Ocorre então uma progressiva atrofia da musculatura lisa que leva a hipomotilidade e alterações das ondas peristálticas <sup>(90, 102)</sup>.

O esôfago é a região do TGI mais frequentemente acometida na ES, em 50-90% dos pacientes <sup>(103)</sup>. Ocorre fibrose e atrofia da musculatura lisa nos dois terços inferiores do esôfago, sendo a parte superior usualmente poupada <sup>(104)</sup>. O comprometimento da musculatura lisa esofágica resultante da fibrose frequentemente leva a refluxo gastroesofágico (RGE) patológico, definido como o movimento retrógrado do conteúdo gástrico para dentro do esôfago. RGE ocorre devido a incompetência da barreira representada pelo esfíncter inferior do esôfago (EIE), uma região situada na junção esofagogástrica que é formada por musculatura lisa com maior tônus. Na ES, é comum a disfunção do EIE, que ocorre por incapacidade do mesmo em manter pressões adequadas <sup>(105)</sup>. O tempo de exposição ao refluxato é aumentado nesses pacientes, como resultado da redução da peristalse e do clearance esofágico. Além disso, é frequente a redução da secreção de saliva, a qual tem capacidade de neutralização ácida <sup>(90, 106)</sup>. A redução ou ausência da peristalse no esôfago distal também parece ter muita importância como fator causal do RGE, pois foi demonstrado que os pacientes com aperistalse distal apresentavam maior exposição ao ácido gástrico do que os sem aperistalse <sup>(107)</sup>. Este estudo também

encontrou menores níveis pressóricos a nível do esfíncter superior do esôfago (ESE) nos pacientes com aperistalse, além de relatar que somente os pacientes com aperistalse apresentaram exposição ácida proximal (RGE proximal ou alto), confirmando o importante papel da peristalse adequada no esvaziamento esofágico e proteção contra o RGE em toda a extensão do órgão.

Assim, RGE patológico, ou doença do RGE (DRGE) é responsável pela maior parte dos sintomas apresentados por cerca de 80% dos pacientes com ES. Os sintomas mais comuns são a dor epigástrica ou retroesternal em queimação, regurgitação e disfagia, tipicamente para alimentos sólidos e líquidos <sup>(103)</sup>. No entanto, sintomas não são um indicativo sensível para a presença de doença esofágica esclerodérmica e DRGE, já que até 60% deles, em algumas séries de casos, podem ser assintomáticos, especialmente nas fases iniciais de comprometimento do esôfago <sup>(108)</sup>. Anormalidades das pressões esfíncterianas e da motilidade esofágica são muito frequentes nos pacientes esclerodérmicos e tem pobre correlação com os sintomas. Uma série de 183 pacientes consecutivos revelou que todos os pacientes que referiam sintomas tinham anormalidades manométricas, porém 64% dos pacientes assintomáticos também tinham manometria anormal <sup>(109)</sup>.

A complicação esofágica mais frequente na ES é a esofagite erosiva causada pelo RGE patológico <sup>(110)</sup>. A esofagite de refluxo prolongada pode levar ao desenvolvimento de estenose segmentar do esôfago <sup>(90)</sup>. Outra grave complicação do RGE é o esôfago de Barrett, lesão com reconhecido potencial de malignização, que foi reportada na ES em 37% de uma série de 27 pacientes, sendo o adenocarcinoma de esôfago encontrado em dois dos nove pacientes com esta complicação <sup>(111)</sup>. Recentemente, um estudo multicêntrico prospectivo de 3 anos de acompanhamento observou uma incidência de 4% ao ano de adenocarcinoma esofágico em pacientes com ES com esôfago de Barrett <sup>(112)</sup>.

Para o diagnóstico do envolvimento do esôfago e da DRGE na ES podem ser utilizados cinco métodos: esofagograma contrastado com bário, cintilografia, endoscopia digestiva alta (EDA), manometria esofágica e monitoramento do pH esofágico. O esofagograma é um método que mostra alterações mais avançadas do envolvimento esofágico, como constrictões, aperistalse e presença de úlceras, porém fornece poucas informações em relação à presença e extensão do RGE, mesmo com a técnica de duplo contraste <sup>(113)</sup>. Por outro lado, a EDA é o melhor método para diagnosticar as lesões mucosas decorrentes do RGE, mostrando no entanto as alterações de peristalse somente em fases

mais avançadas <sup>(114)</sup>. Em comparação com a manometria e pHmetria, a cintilografia tem boa especificidade e elevado valor preditivo positivo para o diagnóstico de pacientes com RGE e esofagite, porém mostra-se pouco sensível (36%) <sup>(115)</sup>, além de ser um exame caro e com pouca disponibilidade na maioria dos centros. O método considerado o padrão ouro no diagnóstico da dismotilidade esofágica é a manometria, que mede as pressões dos esfíncteres e do corpo do esôfago, analisa a efetividade, a amplitude e a duração das contrações peristálticas, além de avaliar a morfologia, localização e relaxamento dos esfíncteres esofágicos superior e inferior. Este teste tem alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico das alterações pressóricas e peristálticas do esôfago e é capaz de detectá-las precocemente no decorrer do envolvimento visceral na ES, além de ser útil como exame pré operatório na cirurgia de DRGE e como monitoração do resultado da mesma <sup>(114)</sup>.

Embora as alterações manométricas esofágicas possam identificar pacientes com alto risco de desenvolver RGE, o monitoramento contínuo do pH esofágico (pHmetria) durante 24 horas é considerado o teste mais sensível para o diagnóstico desta complicação <sup>(116)</sup>. Contudo, a pHmetria de 24 hs não detecta o refluxo não ácido. Mais recentemente, foi introduzido o método de monitoramento do pH esofágico associado à medida da impedância intraluminal, o qual tem a grande vantagem de simultaneamente localizar, quantificar e classificar os episódios de refluxo como ácidos, fracamente ácidos ou alcalinos <sup>(116)</sup>. No entanto, devido ao elevado custo, sua disponibilidade ainda é muito restrita.

## **1.7 Envolvimento pulmonar na Esclerose Sistêmica**

O envolvimento pulmonar na ES é comum, ocorrendo em 40 à 80% dos casos na dependência do método diagnóstico empregado, extensão do comprometimento e etnia. As formas mais comuns de comprometimento pulmonar são a doença intersticial e a HAP, as quais constituem a principal causa de mortalidade relacionada à doença <sup>(117)</sup>. Mais raramente, também podem ocorrer pneumonias aspirativas, pleurite com derrame pleural, pneumopatia induzida por drogas e neoplasias <sup>(118)</sup>.

Pacientes esclerodérmicos com pneumopatia intersticial apresentam mais frequentemente doença difusa e os antígenos de histocompatibilidade de Classe II HLA DR3 e DR52A e/ou a presença do autoanticorpo anti-Sc170 <sup>(118)</sup>. O padrão histológico mais comum na

lesão intersticial observada na ES (76% dos casos) é a pneumonia intersticial não específica (PINE), com predomínio de lesões histológicas inflamatórias homogêneas em estágios semelhantes de evolução, com poucas alterações fibróticas e destruição, distribuídas simetricamente. Apenas 11% dos casos apresentam um padrão histológico de pneumonia intersticial usual (PIU) <sup>(119)</sup>. A PINE contrasta com a PIU vista na fibrose pulmonar idiopática na qual predominam lesões heterogêneas, em diferentes estágios evolutivos e maior quantidade de fibrose e destruição parenquimatosa <sup>(120)</sup>. Assim, o fato de que a pneumonia intersticial da ES apresenta melhor prognóstico do que a FPI <sup>(121)</sup> teoricamente poderia ser explicado pelo aspecto histológico. No entanto, um estudo prospectivo demonstrou que na ES a evolução desfavorável do envolvimento pulmonar intersticial depende, mais do que do padrão histológico, da gravidade da doença por ocasião da abertura do quadro pulmonar e da velocidade em que o mesmo evolui, conforme refletido pelos baixos níveis iniciais de difusão de monóxido de carbono (DLco) e sua deterioração em um período de três anos de observação <sup>(120)</sup>.

Na ES ocorrem lesões pulmonares inflamatórias, destrutivas e fibróticas <sup>(118)</sup> e por este motivo o envolvimento pulmonar intersticial tem sido também chamado de alveolite fibrosante (AF), onde a inflamação evolui progressivamente para fibrose <sup>(54, 118)</sup>. No entanto, este termo está atualmente caindo em desuso. Do ponto de vista fisiopatológico, linfócitos TCD8+ foram encontrados no tecido pulmonar de pacientes esclerodérmicos com pneumonia intersticial, produzindo citocinas profibróticas do tipo TH2, principalmente IL-4, sendo associado à redução na função pulmonar desses pacientes, o que não foi observado em pacientes com ES sem AF <sup>(122)</sup>. O tratamento de pacientes com ES/AF com imatinib, um inibidor da tirosino quinase, foi capaz de reduzir o número de linfócitos produtores de IL-4 e aumentar o número de linfócitos CD4+ <sup>(123)</sup>. Isso foi observado nos pacientes que tiveram melhora ou estabilização do quadro pulmonar e não ocorreu em um paciente que teve piora da pneumopatia, sugerindo que um redirecionamento no perfil dos linfócitos produtores de citocinas TH2 pode afetar positivamente a evolução da AF na ES. Os linfócitos B também encontram-se ativados precocemente no curso da doença e produzem autoanticorpos que provavelmente exercem papel patogênico nesta condição <sup>(118)</sup>, como os anticorpos antifibroblastos, que reconhecem a alfaenolase nessas células e cuja presença se associa com pneumopatia intersticial e positividade para o anti-Sc170 <sup>(124)</sup>.

O diagnóstico precoce da AF e a avaliação de sua relevância clínica é muito importante no manejo do paciente esclerodérmico, pois os resultados de modo geral positivos dos estudos com ciclofosfamida (125-126) e micofenolato mofetil (127) sugerem que o tratamento oportuno poderia alterar a evolução da fibrose. Os principais sintomas do envolvimento pulmonar intersticial são inespecíficos e incluem dispnéia progressiva aos esforços, tosse seca e sensação de fadiga, sendo raros a dor torácica e a hemoptise. No entanto, os sintomas costumam ocorrer em fases avançadas da doença, quando já presentes alterações ao exame físico, como os característicos estertores crepitantes pulmonares basais, ditos “em velcro” (119). Portanto, é importante monitorar os pacientes por meio da busca ativa de envolvimento pulmonar com a utilização das provas de função pulmonar e dos exames de imagem.

A avaliação da função pulmonar, tanto por meio da espirometria como da pletismografia e a medida da  $D_{LCO}$  são essenciais para diagnosticar e monitorar o envolvimento pulmonar. A espirometria é um método barato, reprodutível e amplamente disponível, capaz de definir o padrão ventilatório obstrutivo ou de sugerir presença de um padrão restritivo. No entanto, o método depende também da cooperação do paciente e do treinamento do técnico (128). Devem ser avaliadas a capacidade vital forçada (CVF), o volume expiratório forçado no primeiro segundo ( $VEF_1$ ) e a relação entre  $VEF_1$  e CVF. Uma espirometria sugestiva de defeito restritivo, que caracteriza o envolvimento pulmonar intersticial, apresenta redução na CVF e  $VEF_1$ , com relação  $VEF_1/CVF$  normal ou aumentada. A pletismografia é útil na definição do padrão restritivo, caracterizado por redução da capacidade pulmonar total (CPT). Outro importante método de avaliação da função pulmonar é a medida da  $D_{LCO}$ , a qual permite avaliar as trocas gasosas que ocorrem ao nível da membrana alveolocapilar. A  $D_{LCO}$  é um marcador confiável da gravidade do envolvimento intersticial nesses pacientes, além de ter valor prognóstico. Entretanto, apesar de ser bastante sensível, a redução da  $D_{LCO}$  não permite a diferenciação entre os componentes vascular ou parenquimatoso da alteração alveolocapilar (128). Assim como a pletismografia, tem como limitantes sua complexidade e custo elevado.

Quanto aos métodos de imagem, a radiografia de tórax, apesar de ser bem mais barata, segura e estar globalmente disponível, é infelizmente bem menos sensível que a TC no diagnóstico das pneumopatias intersticiais, detectando apenas 39% dos casos contra

91% da TC em uma série de pacientes com ES <sup>(129)</sup>. A TC de tórax realizada com técnica de alta resolução (TCAR) ou de cortes finos (1 mm de espessura) é uma ferramenta sensível (90-100%), reprodutível e específica <sup>(130)</sup>, portanto considerada hoje o padrão ouro para o diagnóstico do envolvimento pulmonar intersticial na ES. Para o monitoramento destes pacientes, utiliza-se a combinação das provas de função pulmonar com a TCAR, que deve ser realizada por ocasião do diagnóstico de ES e, se normal, apenas após dois e cinco anos, a não ser que haja declínio nas provas de função pulmonar, pois foi demonstrado que 85% dos pacientes esclerodérmicos com TCAR normal ao diagnóstico não irão apresentar EPI em 5 anos <sup>(130)</sup>. No entanto, estas recomendações devem ser individualizadas, sendo importante levar em consideração que pacientes com forma difusa agressiva, especialmente nos primeiros anos de evolução e/ou com anti-Scl70 positivo, pacientes do gênero masculino e negros apresentam maior risco de desenvolver EPI e seu monitoramento deveria ser mais frequente <sup>(131)</sup>.

As principais alterações relacionadas à pneumopatia intersticial encontradas na TCAR são as seguintes: (a) atenuações em vidro fosco (VF), visualizadas como um aumento da densidade dos pulmões, devido a maior atenuação dos feixes de raios-X, onde ainda é possível se identificar os contornos dos vasos e estruturas brônquicas no interior da área pulmonar, e que representam geralmente lesão inflamatória reversível, porém podem também ser causadas por fibrose incipiente; (b) reticulação fina intralobular, alteração da densidade pulmonar manifesta pela presença de inúmeras imagens lineares, arranjadas irregularmente, dando a impressão visual de que o pulmão normal está sendo visto através de um fino tecido reticular transparente, típico de envolvimento intersticial e que significa presença de fibrose; (c) faveolamento, espaços císticos (3 a 30 mm), de paredes relativamente espessas (< 5 mm), os quais, agrupados, se dispõem habitualmente em camadas, inicialmente na região subpleural, e se assemelham a um favo-de-mel, representando fibrose estabelecida; (d) distorções da arquitetura brônquica, incluindo bronquiectasias e bronquioloectasias de tração, que são dilatações brônquicas ou bronquiolares, irregulares, associadas a alterações parenquimatosas circunjacentes (opacidades reticulares, em vidro-fosco ou faveolamento) e decorrentes de retração por fibrose; e (e) espessamento dos septos interlobulares, uma opacidade linear fina, que corresponde aos septos conjuntivos periféricos espessados, podendo representar edema, inflamação ou fibrose <sup>(132)</sup>. Na PINE, geralmente há predomínio das lesões com significado mais inflamatório que fibrótico, como as atenuações em VF e espessamento septal interlobular, com

menor grau de faveolamento e lesões de arquitetura brônquica. As lesões costumam ser bilaterais, simétricas e predominar nas regiões subpleurais dos lobos inferiores. Na PIU, há nítido predomínio do faveolamento e distorções arquiteturais, que representam fibrose estabelecida <sup>(133)</sup>.

Na avaliação do paciente esclerodérmico, é importante definir, em associação com as provas funcionais pulmonares, o significado clínico do EPI a fim de planejar a estratégia terapêutica mais adequada. Para a análise objetiva e padronizada das alterações tomográficas na ES tem sido desenvolvidos diferentes escores, porém os mesmos tem sido utilizados em pesquisa e não na prática clínica <sup>(134)</sup>. No entanto, mesmo em estudos clínicos seu uso não tem sido padronizado, sendo empregados diferentes escores <sup>(135-136)</sup> para analisar as tomografias.

Outro método que tem sido utilizado na avaliação da pneumopatia intersticial na ES é o lavado broncoalveolar (LBA). Por meio da injeção seletiva nos brônquios de volumes variáveis de solução salina e sua posterior recuperação, o LBA permite avaliar a celularidade do aspirado e a dosagem de substâncias solúveis no mesmo, sendo que níveis aumentados de eosinófilos e/ou neutrófilos significam presença de alveolite, o que poderia, segundo Volpinari e cols., significar que estes pacientes teriam um curso mais grave de doença pulmonar <sup>(137)</sup>. Entretanto, atualmente a maioria dos autores considera que o LBA no EPI é útil apenas para descartar presença de infecção oportunista e em ambiente de pesquisa para análise de celularidade e elementos solúveis, não servindo para guiar o tratamento <sup>(118)</sup>. Entretanto, foi demonstrado que uma contagem de eosinófilos no LBA acima de 5% está associado com pior prognóstico pulmonar e menor sobrevida em pacientes com ES <sup>(120)</sup>. Outro estudo muito recente também relatou que pacientes esclerodérmicos com alveolite ao LBA apresentavam maior risco de desenvolver ou aumentar a quantidade de faveolamento à TCAR, desenvolver padrão funcional pulmonar restritivo e que a extensão do faveolamento associou-se com maior mortalidade de causa pulmonar <sup>(138)</sup>. O LBA é, no entanto, um método invasivo e desconfortável para o paciente e exige um médico bem treinado para a sua execução.

Outro método, não invasivo, para a avaliação das secreções respiratórias é o escarro induzido. O mesmo examina a expectoração de secreções das vias aéreas, cuja análise de celularidade fornece importantes informações a respeito de alterações inflamatórias das vias respiratórias e permite também a dosagem de substâncias solúveis. Desde a década de 1950, diversos autores tem utilizado o exame do escarro induzido principalmente no diagnóstico da asma e de sua

gravidade <sup>(139-141)</sup>, sendo que a partir de 1992 o escarro induzido passou a ser empregado na pesquisa clínica da asma <sup>(142)</sup>. A indução do escarro é feita por meio da inalação de concentrações crescentes de salina hipertônica, precedido por uma espirometria pré e pós uso de broncodilatador em dose padronizada. O método foi validado por Pizzichini e cols. em 1996 <sup>(143)</sup> e é hoje considerado um teste reprodutível e sensível na avaliação da inflamação das vias aéreas, com as grandes vantagens de ser não invasivo, de baixo custo e de fácil execução com treinamento adequado. Foi demonstrado também que o escarro induzido pode ser utilizado no estudo das doenças pulmonares intersticiais, como as pneumopatias ocupacionais <sup>(144)</sup>, a sarcoidose <sup>(145)</sup> e em outras doenças intersticiais, como a FPI <sup>(146)</sup>, a alveolite alérgica extrínseca e EPI relacionado à doença de Chron <sup>(147)</sup>. Mais recentemente, foi relatado o uso do escarro induzido no estudo das pneumopatias intersticiais associadas às doenças do tecido conectivo <sup>(148)</sup>. No EPI da ES, alguns estudos utilizando o escarro induzido tem sido publicados <sup>(149-151)</sup>, evidenciando que o método é útil na investigação clínica destes pacientes, talvez como um teste complementar ao LBA ou potencialmente como um substituto não invasivo para o mesmo <sup>(150)</sup>.

O envolvimento das vias aéreas não tem sido considerado um elemento relevante na doença pulmonar da ES e vem sendo muito pouco investigado. No entanto, estudos de autópsia no passado revelaram a presença de lesões brônquicas em pacientes esclerodérmicos <sup>(152-153)</sup>. Durante a década de 1970, foi aventada a hipótese de que, considerando a elevada prevalência de disfunção das vias aéreas que foram encontradas nesses pacientes, as pequenas vias aéreas pudessem ser o sítio inicial de lesão no envolvimento pulmonar da ES e um indicador precoce do mesmo <sup>(154)</sup>. Entretanto, com o tempo a maioria dos autores passou a acreditar que a disfunção de vias aéreas estaria mais associada ao concomitante tabagismo nesses pacientes <sup>(155-156)</sup>. Por outro lado, estudos utilizando escarro induzido evidenciaram alterações inflamatórias das vias aéreas de pacientes com ES, cujo significado clínico não foi demonstrado <sup>(148, 150)</sup>. Portanto, persistem controvérsias a respeito da prevalência e da relevância clínica do envolvimento das vias aéreas na ES <sup>(165-167)</sup>.

A hiperresponsividade das vias aéreas a estímulos externos (hiperresponsividade brônquica, HB) é um achado característico porém não exclusivo da asma, podendo ser observada em outras situações clínicas, principalmente a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). O teste padrão ouro para o seu diagnóstico é feito com inalação de concentrações crescentes de metacolina, um potente agente

parassimpaticomimético capaz de induzir broncoconstricção mesmo em pessoas normais, porém em concentrações bem menores nos indivíduos com HB <sup>(157)</sup>. Nas doenças do tecido conectivo, a presença de HB foi documentada na Síndrome de Sjögren (SS) <sup>(158-159)</sup>. Embora os mecanismos responsáveis pelo seu desenvolvimento não sejam conhecidos, acredita-se que ocorram alterações qualitativas e quantitativas na secreção do muco, causando a HB. Na ES, HB também foi relatada, em associação à SS <sup>(160)</sup>.

### **1.8 Associação entre RGE, Aspiração e Envolvimento Pulmonar na Esclerose Sistêmica**

Diversos estudos tem evidenciado a provável associação entre a aspiração do conteúdo gástrico decorrente de DRGE e o desenvolvimento de sintomas pulmonares e alterações da função pulmonar. Por exemplo, um estudo avaliou a função pulmonar em 147 obesos e demonstrou níveis reduzidos de  $D_{LCO}$  naqueles com GER mais importante <sup>(161)</sup>.

Envolvimento pulmonar intersticial (EPI) e fibrose pulmonar, especialmente a fibrose pulmonar idiopática (FPI), também tem sido associadas com RGE e aspiração <sup>(162-166)</sup>, partindo da observação de que a presença de RGE é mais frequente em indivíduos com FPI em comparação a controles <sup>(167-169)</sup>. Raghu e cols. trataram 4 pacientes com FPI e RGE somente com supressão adequada de secreção ácida gástrica (documentada por monitoramento do pH esofágico) e verificaram que a função pulmonar manteve-se estável por um período de quatro anos <sup>(164)</sup>, havendo associação entre a não adesão ao tratamento com a deterioração da função pulmonar e a retomada do tratamento com estabilização da mesma.

A aspiração assintomática e crônica de pequenos conteúdos de refluxato, mecanismo conhecido como microaspiração, seria responsável pelo desenvolvimento ou o agravamento de lesões fibróticas pulmonares. <sup>(170)</sup>. Um modelo animal utilizando ratos demonstrou que a instilação de pequenas quantidades de ácido nos pulmões, em comparação com salina, por até 16 semanas, causava lesões compatíveis com bronquiolite obliterante e fibrose pulmonar, com a liberação de diversas citocinas pro-inflamatórias e profibróticas, principalmente o  $TGF\beta$  <sup>(171)</sup>. Este mecanismo tem sido fortemente implicado na patogênese da rejeição em transplantes pulmonares causado por bronquiolite obliterante, a lesão mais importante nesse contexto <sup>(172)</sup>.

Além disso, o tratamento cirúrgico do RGE com funduplicatura foi capaz de prolongar a sobrevida do enxerto <sup>(173-174)</sup>.

Desde a década de 1950 foi observada associação entre doença esofágica e envolvimento pulmonar na ES <sup>(175)</sup>. Johnson e cols. demonstraram que o grau de redução da  $D_{LCO}$  era proporcional aos achados cintilográficos de aspiração e de monitoramento do pH esofágico em 13 pacientes com ES <sup>(176)</sup>. Lock e cols. encontraram maior redução nos volumes e capacidades pulmonares em pacientes esclerodérmicos com dismotilidade esofágica à manometria <sup>(177)</sup>. Por outro lado, Troshinsky e cols. não encontraram diferenças nas provas de função pulmonar e  $D_{LCO}$  em 39 pacientes com e sem RGE e aperistalse, em duas aferições com diferença de um ano entre as mesmas <sup>(177)</sup>.

Os resultados de estudos mais recentes vem favorecendo a hipótese de associação entre RGE, aspiração e envolvimento pulmonar na ES <sup>(178-181)</sup>. Em um estudo feito no Brasil, pacientes esclerodérmicos submetidos à biópsia pulmonar a céu aberto apresentavam um padrão de fibrose broncocêntrica com corpos estranhos intraluminais em um terço deles. Todos tinham dismotilidade esofágica e moderada alteração de função pulmonar, a qual se manteve estável após um ano de tratamento exclusivamente com terapia antirefluxo <sup>(182)</sup>. No entanto, mais recentemente, um estudo prospectivo acompanhou 105 pacientes com ES por 72 +/- 42 meses e demonstrou que somente a forma clínica difusa, e não a dismotilidade esofágica, foi um fator capaz de predizer o declínio funcional pulmonar. <sup>(183)</sup> Uma recente revisão sistemática <sup>(184)</sup> sobre o tema concluiu que, na ES, envolvimento esofágico e pulmonar são comuns, sendo a associação entre estes acometimentos demonstrada em alguns estudos, porém não em outros, portando as evidências até o momento não permitem estabelecer uma relação causal entre eles.

Para que a relação de causa e efeito entre microaspiração e doença respiratória possa ser estabelecida, é essencial demonstrar objetivamente a ocorrência da primeira. Com este objetivo, modelos animais de aspiração foram estudados com diferentes metodologias, como a pesquisa de proteínas do leite nos macrófagos <sup>(185)</sup> ou grânulos de amido <sup>(186)</sup> no LBA de ratos, porém não há nenhum teste que possa ser considerado o padrão ouro. Outro método desenvolvido com este fim foi a pesquisa de lipídios em macrófagos alveolares no LBA ou no escarro, corados com Sudan vermelho ou negro ou óleo vermelho O (Oil red O). A presença de macrófagos contendo lipídios em quantidades significativas indicaria a ocorrência de aspiração de conteúdo digestivo, já que lipídios não seriam substâncias normalmente encontradas no

aparelho respiratório, exceto por fagocitose de algum material endógeno<sup>(187)</sup>. O teste tem sido considerado como um dos critérios no diagnóstico de pneumonia lipóidica, que tem curso insidioso e simula uma pneumopatia intersticial, causada pela inalação crônica de material lipídico (óleo mineral, laxantes, etc)<sup>(188)</sup>. Tem sido demonstrada também sua utilidade no diagnóstico de pneumonia aspirativa em crianças<sup>(189)</sup>.

Em 1985, Corwin e Irwin<sup>(190)</sup> utilizaram este teste e descreveram o índice lipídico em macrófagos (ILM), como sendo a soma simples dos escores de quantificação de 100 macrófagos consecutivos (0-4, conforme a quantidade de lipídios no citoplasma), podendo variar de 0 a 400. Avaliando o ILM no LBA de três grupos, um com aspiração bem definida, um sem aspiração e um grupo de controles normais, os autores relataram que o ILM maior ou igual a 100 apresentou sensibilidade e valor preditivo positivo de 100% e especificidade de 57% para o diagnóstico de aspiração. Desde então, diversos estudos avaliaram a utilidade do teste no diagnóstico de aspiração em crianças e adultos, utilizando o ILM ou outros modos de quantificação no LBA, com resultados controversos<sup>(191-195)</sup>. Parameswaram e cols.<sup>(196)</sup> avaliaram o ILM no escarro induzido, que foi calculado em 29 indivíduos, dos quais 20 apresentavam à pHmetria ao menos um episódio de RGE orofaríngeo, definido como a queda do pH esofágico abaixo de 4 a nível de um eletrodo posicionado a 25 cm do EEI, que foi considerado como o “padrão ouro” para o diagnóstico de aspiração. A média do ILM foi significativamente maior nos indivíduos com RGE orofaríngeo do que naqueles que não o apresentavam. Os autores calcularam que um valor de ILM de sete no escarro induzido tem sensibilidade de 90%, especificidade de 86%, valor preditivo positivo de 95% e valor preditivo negativo de 80% para o diagnóstico de microaspiração. Köksal e cols.<sup>(197)</sup> avaliaram 22 pacientes com esofagite de refluxo e sintomas respiratórios não explicados, calculando o ILM no escarro induzido dos mesmos e não encontrou diferença significativa em comparação a indivíduos sem doença pulmonar e sem sintomas digestivos. Um estudo recente<sup>(198)</sup> avaliou o ILM em 34 pacientes transplantados de pulmão com ocorrência de complicações (infecções recorrentes e rejeição) e verificou que aqueles com valores elevados (>150) apresentavam correlação significativa com alterações à pHmetria. Os autores sugerem que o teste deveria ser feito como uma triagem de pacientes com DRGE e microaspiração, com alto risco de perda do enxerto. De modo geral, portanto, este teste tem sido

considerado, apesar de sua baixa especificidade, um método útil na avaliação de pacientes com suspeita de aspiração <sup>(199)</sup>.

## 1.9 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Conforme discutido, apesar da associação entre envolvimento pulmonar intersticial e alterações esofágicas na ES ser amplamente documentada <sup>(178, 180-181, 200-202)</sup>, a real natureza dessa associação permanece obscura. Além disso, a microaspiração crônica teoricamente também poderia gerar anormalidades das vias aéreas, como inflamação e hiperresponsividade brônquica <sup>(203-204)</sup>. Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a propor, por meio de um método objetivo, a demonstração de microaspiração em pacientes com ES e sua associação com envolvimento do aparelho respiratório. A utilização do método da pesquisa de lipídios em macrófagos por meio do escarro induzido (ILM) é inédita nesta área.

Considerando o mecanismo de microaspiração crônica como um dos fatores potencialmente envolvidos na etiopatogênese do envolvimento pulmonar na ES, a otimização do tratamento do RGE e da dismotilidade esofágica, inclusive com manejo cirúrgico nos casos mais graves e refratários, poderia ter um impacto significativo no tratamento de uma parcela de pacientes com ES. Esta abordagem, em associação ao tratamento imunossupressor, conforme indicado, seria potencialmente capaz de reduzir a morbidade e melhorar o prognóstico desses pacientes.

O presente estudo objetiva utilizar um método simples e não invasivo para identificar microaspiração e inflamação das vias aéreas nesses pacientes, associando-as com as alterações tomográficas e funcionais da doença.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral (primário):**

- Em pacientes com esclerose sistêmica, demonstrar a ocorrência de microaspiração ácido-péptica, identificada pelo índice lipídico de macrófagos no escarro induzido e verificar sua associação com comprometimento pulmonar intersticial e das vias aéreas, avaliado pela tomografia computadorizada de tórax e pelo escarro induzido e verificar também sua associação com as anormalidades esofágicas.

### **2.2 Objetivos Específicos (secundários):**

- Avaliar a prevalência de comprometimento esofágico nesta população e quantificá-la, estabelecendo associações com o envolvimento pulmonar;
- Elaborar um escore de alterações tomográficas a fim de identificar e quantificar o grau de envolvimento pulmonar intersticial nestes pacientes;
- Determinar o comprometimento funcional pulmonar destes pacientes e associá-lo com as alterações esofágicas, anatômicas e de celularidade do escarro induzido;
- Estabelecer um perfil de celularidade do escarro e estimar a positividade do teste de broncoprovocação com metacolina nesta população, comparando-a com um grupo controle.



## 3 MÉTODOS

### 3.1 Desenho e Sujeitos do estudo

**Desenho do estudo:** Transversal, contemporâneo, aninhado em uma coorte de pacientes com ES.

**Sujeitos do estudo:**

**Pacientes:**

**Crítérios de Inclusão :** Pacientes com ES, formas limitada ou difusa, com início de doença há pelo menos seis meses, diagnosticados segundo os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (1), provenientes do ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

**Crítérios de exclusão:**

- Pacientes com hipertensão arterial pulmonar (estimativa indireta da pressão arterial pulmonar maior ou igual a 35 mmHg) ao ecocardiograma realizado nos últimos seis meses anteriores à inclusão do paciente no estudo;
- Tabagistas ou ex-tabagistas há menos de cinco anos;
- Pacientes com doenças pulmonares crônicas e doença cardíaca clinicamente significativa;
- Pacientes com história ou diagnóstico prévio de asma;
- Pacientes com história de exposição ambiental a agentes inalatórios potencialmente indutores de doença pulmonar;
- Pacientes com outras doenças pulmonares que poderiam alterar o ILM, tais como embolia gordurosa, doenças de armazenamento lipídico, proteinose alveolar e pneumonia lipóidica.

**Controles:** foi selecionado um grupo de voluntários recrutados para participar de um estudo objetivando determinar os valores normais da celularidade do escarro na cidade de Florianópolis (205). O recrutamento foi feito por meio de divulgação na mídia local e nas universidades localizadas na cidade de Florianópolis. **Crítérios de Inclusão:** Indivíduos sem sintomas respiratórios ou história de doença respiratória crônica presente ou no passado, não obesos e não fumantes, livres de infecção respiratória por no mínimo quatro semanas, com

espirometria normal ( $VEF_1 > 80\%$  do previsto e  $VEF_1/CVF > 80\%$ ). Os controles foram pareados por idade com os pacientes e utilizados apenas para fins de comparação com os pacientes em relação à celularidade do escarro, espirometria e responsividade brônquica.

**Visitas do estudo:** o estudo consistiu de quatro visitas: a primeira visita incluiu entrevista, exame físico e coleta de sangue, espirometria, teste de broncoprovocação e escarro induzido; na segunda visita foi realizada a pletismografia pulmonar, na terceira a manometria esofágica e pHmetria e na quarta visita foi feita a TCAR de tórax. Os controles fizeram somente a primeira visita e não realizaram coleta de sangue.

### **3.2 Local do Estudo**

O estudo foi realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, no NUPAIVA (Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas).

### **3.3. Aspectos Éticos**

Todos os sujeitos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido antes de serem incluídos no estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSC sob número 185/2009 (ANEXO).

### **3.4 Medidas**

#### **3.4.1 Protocolo clínico e testes laboratoriais**

##### **Protocolo clínico:**

Dados demográficos: Nome, sexo, idade, etnia.

Dados clínicos: tempo de início da doença (considerada quando do aparecimento dos primeiros sintomas exceto fenômeno de Raynaud); sintomas respiratórios atuais: tosse e dispnéia; e sintomas digestivos: dor epigástrica e/ou pirose, disfagia e percepção de refluxo (regurgitação).

Exame físico: avaliação do escore cutâneo de Rodnan modificado (escore validado <sup>(206)</sup> de quantificação de envolvimento cutâneo na ES, onde é atribuído um valor de 0 a 3, de acordo com a intensidade do espessamento cutâneo, a cada área analisada, em 17 áreas corporais: dedos das mãos, dorso das mãos, antebraços, braços, face, tórax, abdome, coxas, pernas e pés). Variação possível: 0 a 51.

Laboratório :

Velocidade de hemossedimentação (VHS) pelo método de Westergren, proteína C reativa (PCR) dosada por turbidimetria, FAN (fator anti-nuclear) por imunofluorescência indireta em células Hep-2, anti-Scl 70 (anti-topoisomerase I) e anti-centrômero (ACA) pelo método de enzimmunoensaio (HEMAGEN, Columbia, EUA).

### **3.4.2 Manometria Esofágica**

Como preparação para o exame, o paciente foi instruído a não tomar medicamentos que pudessem alterar a motilidade esofágica (bloqueadores dos canais de cálcio e medicamentos procinéticos) por 12 horas antes do procedimento.

O teste foi realizado utilizando-se um polígrafo (marca Dynapack MPX 816), que é um sistema de aquisição de dados com oito canais. O mesmo é ligado a uma bomba de infusão de água e a um computador equipado com programa de análise dos dados fornecidos pelo sistema. A bomba de infusão era de perfusão linear, de alta pressão, baixo fluxo, com difusor de oito canais. A sonda manométrica consiste de vários tubos finos, perfundidos com água, com orifícios laterais. Cada sonda contém orifícios a uma determinada distância. Esses cateteres finos são colados juntos formando um cateter mais espesso, de aproximadamente 5 a 6 mm. A bomba infunde água nos pequenos cateteres constantemente e está acoplada a um sistema de transdução de pressão, o polígrafo. Quando um determinado segmento da sonda se encontra numa zona de maior pressão, o orifício que se encontra nesse segmento ficará obstruído, dificultando a saída de água. O sistema, que deve ser de baixa complacência, traduz essa dificuldade como uma maior pressão no local correspondente ao orifício, e essa informação é expressa no computador por meio de um gráfico.

O paciente foi colocado em decúbito dorsal e a sonda de manometria introduzida pela nasofaringe, previamente anestesiada com lidocaina a 2%, até chegar ao estômago. O cateter foi então retirado lentamente, pausando em vários pontos do esôfago. O paciente foi solicitado a engolir pequenas quantidades de água. Um gráfico foi então gravado, mostrando as ondas de contração do esôfago e o complexo de deglutição. O posicionamento simultâneo de quatro canais radiais ao nível do esfíncter superior do esôfago (ESE) avaliou o tônus esfíncteriano, o relaxamento do esfíncter, a coordenação faringoesofágica e a posição desse esfíncter. Posicionando-se quatro canais, radialmente, ao nível do esfíncter esofágico inferior (EIE) e do

ESE, foi possível obter, pela da média dos dados, valores das pressões do EIE e do ESE.

Para a análise foram consideradas as seguintes medidas: presença ou ausência de hipotonia dos esfíncteres esofágicos superior e inferior, medidas das suas pressões médias, proporção de contrações peristálticas efetivas e presença de aperistalse parcial (dois terços inferiores do esôfago) ou total.

### **3.4.3 Monitoração do pH esofágico de 24 horas (pHmetria)**

Para a realização deste teste, todas as medicações contra refluxo gastroesofágico foram suspensas por sete dias e os bloqueadores de canais de cálcio e procinéticos por 24 horas antes do teste.

O teste consiste na introdução no esôfago do paciente de uma sonda, em cuja ponta está afixado um eletrodo que, ao contato com o H<sup>+</sup> livre, produz uma corrente elétrica. Essa corrente elétrica é captada e gravada continuamente em um aparelho e posteriormente transferida a um computador. No computador os sinais elétricos são exibidos na forma de pH, após calibração prévia.

Foi utilizado um dispositivo de duplo canal (introduzido por via nasofaríngea), contendo um eletrodo ou sensor inferior para medida do pH posicionado 5 cm acima do esfíncter esofágico inferior (EEI, localizado por meio de manometria). Refluxo gastro-esofágico foi considerado presente quando ocorreu queda do pH abaixo de 4.0 no sensor. O eletrodo foi ligado a um sistema de gravação digital portátil, que registrou o pH a cada 4 minutos durante cerca de 24 horas, sendo que o paciente foi instruído a anotar os horários e quais as atividades realizadas durante o período, anotando também qualquer sintoma digestivo que tenha sentido.

As seguintes medidas foram analisadas: o número total de refluxos ácidos em 24 horas (normal até 47), o número de refluxos ácidos prolongados (com duração acima de 5 minutos, normal até 3), o período total de acidificação (expresso como a porcentagem do tempo total de medida em 24 h em que o pH esteve abaixo de 4.0, normal até 3.2%), e o índice de DeMeester<sup>(207)</sup> (soma simples das pontuações, de acordo com uma tabela padronizada, atribuídas ao número de refluxos ácidos em 24 horas, número de refluxos ácidos prolongados em 24 horas, o mais longo refluxo ácido, fração do tempo com pH inferior a 4, sendo considerados o tempo total, em pé e deitado; valor normal até 15). De acordo com o valor do Índice de DeMeester, o paciente foi

classificado da seguinte forma: sem refluxo gastroesofágico (DeMeester até 15); com RGE leve (DeMeester de 16 até 32) ; com RGE moderado (DeMeester 33 a 55) ; com RGE intenso ou grave (DeMeester igual ou acima de 56). **Envolvimento esofágico acentuado** foi considerado presente naqueles pacientes que apresentavam manometria anormal e/ou RGE moderado a grave.

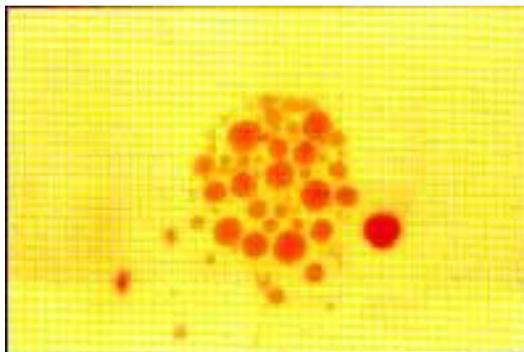
### 3.4.4 Indução e Processamento do Escarro

O escarro foi induzido e processado de acordo com o método descrito por Pizzichini e colaboradores<sup>(143)</sup>. O procedimento foi iniciado após uma espirometria pré e pós-broncodilatadora. A indução do escarro envolveu inalação de um aerossol de solução salina isotônica (0,9%) seguida por solução salina hipertônica em concentrações crescentes (3%, 4% e 5%), produzido por um nebulizador ultra-sônico *Fisoneb* (Canadian Medical Products, Ltd., Markham, Ontario) com débito de 0,87 ml/min e partículas com diâmetro aerodinâmico de massa mediano de 5,58  $\mu\text{m}$ . A inalação do aerossol foi mantida por sete minutos, seguida pela mensuração do  $\text{VEF}_1$ . Antes e nos intervalos do procedimento, os participantes foram orientados a enxaguar a boca, engolir a água e assoar o nariz para minimizar a contaminação com saliva ou descarga pós-nasal. Após a inalação, foram instruídos a tossir vigorosamente e a depositar o escarro em um recipiente estéril. Esses procedimentos foram consecutivamente repetidos, aumentando-se a concentração da solução de solução salina a cada sete minutos, até completar 21 minutos ou até que houvesse queda do  $\text{VEF}_1$  igual ou superior a 20%.

O escarro foi processado dentro de no máximo duas horas após a coleta. Inicialmente, as porções densas do expectorado foram selecionadas a olho nu ou, se necessário, sob visualização através de um microscópio invertido, usando-se um fórceps de 115 mm para separar o escarro da saliva. A fração selecionada foi colocada em um tubo de poliestireno de 15 ml e tratada com quatro vezes o seu volume de ditiotretitol (DTT) a 0,1% (*Sputalysin 10%*; Calbiochem Corp., San Diego, CA). Esta mistura foi agitada por 15 segundos e consecutivamente aspirada e ejetada através de uma pipeta de Pasteur. O tubo de poliestireno foi então colocado em um agitador de mesa (*Dade Tube Rocker*; Baxter Diagnostics Corporation, Miami, FL) e agitado por 15 minutos. Para sustar o efeito do DTT sobre a suspensão de células, foi adicionado solução salina tamponada em fosfato de Dulbecco (D-

PBS) numa quantidade correspondente a quatro vezes o volume inicial de escarro selecionado. A suspensão resultante foi filtrada em um filtro de náilon com microporos de 48  $\mu\text{m}$  (*BBS Thompson*, Scarborough, Ontario) para remover os restos celulares e o muco não dissolvido. A contagem celular total de leucócitos (CT), excluindo-se as células escamosas foi realizada em um hemocitômetro de Neubauer modificado. A viabilidade celular foi determinada por meio do método de exclusão pelo *trypan blue*. Sessenta a oitenta microlitros da suspensão, ajustada para  $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ , foram colocados em recipientes para uma citocentrífuga *Shandon III* (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) e seis citospinas codificadas foram preparadas a 450 rpm por 6 min. Depois de secar ao ar livre, quatro citospinas foram coradas pelo corante de Giemsa para a contagem diferencial de células, sendo que 400 células não escamosas foram contadas na lâmina de melhor qualidade. Os resultados foram expressos como percentual das células não escamosas. Para documentar a presença de microaspiração ácido péptica, duas das citospinas processadas após indução do escarro foram imediatamente coradas com Sudan negro (corante específico para detectar gotículas citoplasmáticas de lipídios fagocitadas pelos macrófagos alveolares). Foram contados cem (100) macrófagos consecutivos, atribuindo-se aos mesmos um escore, conforme descrito por Corwin e Irwin (190), sendo 0: ausência de coloração; 1: uma ou poucas gotículas ; 2: muitas gotículas distintas; 3: muitas gotículas, com núcleo visível e 4: muitas gotículas cobrindo completamente o citoplasma e obscurecendo o núcleo (Figura 2). O “índice lipídico” foi considerado como a soma simples dos escores dos cem macrófagos, podendo portanto variar de 0 a 400.

**Figura 2. Macrófago Alveolar contendo Inclusões Citoplasmáticas de Lipídios (Sudan Negro)**



### 3.4.5 Teste de Broncoprovocação com Metacolina

Teste de broncoprovocação com metacolina foi realizado de acordo com o método descrito por Juniper et al. (208) O aerossol de metacolina (Provocholine®, methacholine chloride powder for inhalation, Methapharm In.) foi gerado por um nebulizador a jato do tipo Wright®, com um débito de 0.13 ml/min e partículas com diâmetro aerodinâmico de massa mediano de 1.3 µm. Em síntese, o procedimento consistiu na inalação de um aerossol de solução salina isotônica (0.9%) por dois minutos, seguida a cada intervalo de 5 minutos da inalação de doses dobradas de metacolina (disponíveis na concentração de 0.03 a 8.0 mg/ml). Após cada período de inalação, foi realizada uma medida de VEF<sub>1</sub>, aos 30 e 90 segundos, e depois, se necessário, a cada um minuto até que o VEF<sub>1</sub> estabilizasse. A mudança percentual no VEF<sub>1</sub> foi determinada a partir do menor valor do VEF<sub>1</sub> pós-salina e depois do menor valor após cada dose de metacolina em relação ao valor basal. O teste prosseguiu até que ocorresse uma queda no FEV<sub>1</sub> igual ou superior a 20% do VEF<sub>1</sub> basal. Os resultados foram expressos através da CP<sub>20</sub> em unidades não cumulativas. Após o teste, a reversibilidade da broncoconstrição provocada foi comprovada 15 minutos após a inalação de 200 µg de salbutamol liberados através de um dispositivo pressurizado com dose medida e administrados com auxílio de um espaçador (Aerochamber®, Trudell Medical International, London, On, Canada).

### 3.4.6 Espirometria

Foi realizada de acordo com as especificações da *American Thoracic Society* (1995) em um espirômetro computadorizado (Koko Spirometer, PDS Instrumentation, Louisville, USA). Os pacientes foram instruídos a não usar qualquer medicação broncodilatadora por no mínimo 6 horas antes do estudo e deveriam estar livres de infecção respiratória por pelo menos 2 semanas. Foram analisados a CVF, oVEF<sub>1</sub> e a razão VEF<sub>1</sub>/CVF. Foram realizadas três manobras e foi considerada aquela que resultou na melhor curva espirométrica. Valores de CVF e VEF<sub>1</sub> foram expressos em litros e comparados com valores de referência para a população adulta normal, previamente estabelecidos, obtidos de Crapo et al, 1981(209). Os resultados referem-se às porcentagens dos índices em relação ao previsto, sendo considerados normais a partir de

80%. Os valores foram obtidos antes e 15 minutos após a inalação de 200 mcg de salbutamol liberados através de dispositivo pressurizado e dosimetrado, com o auxílio de um espaçador bivalvulado (Airchamber, Trudell Medical Internacional, London, Canadá). **Distúrbio ventilatório obstrutivo** foi definido por uma relação VEF<sub>1</sub>/CVF abaixo do percentil 5% do valor previsto. **Distúrbio ventilatório restritivo** foi definido como CPT, medida por pletismografia, abaixo de 80% do previsto <sup>(210)</sup>.

### 3.4.7 Pletismografia Pulmonar e Difusão de Monóxido de Carbono

A pletismografia de corpo inteiro foi realizada pelo processo de diluição do gás hélio, em aparelho Sormedics Vmax228 (Sensor Medics 28000; Sensor Medics, Yorba Linda, CA). A pletismografia foi realizada com o paciente dentro do pletismógrafo. As medidas obtidas por pletismografia analisadas foram: capacidade pulmonar total (CPT), expressa em litros e em % do valor previsto para uma população de referência, assim como o volume residual (VR).

A medida da D<sub>LCO</sub> foi realizada pela técnica de respiração única, com respiração sustentada em aparelho Sormedics Vmax228 (Sensor Medics 28000; Sensor Medics, Yorba Linda, CA), também expressa em litros e em % do valor previsto para uma população de referência. A D<sub>LCO</sub> considerada foi aquela corrigida pelos níveis de hemoglobina sérica e pelo volume alveolar (D<sub>LCO/VA</sub>).

### 3.4.8 Tomografia Computadorizada de Tórax de Alta Resolução

Foi realizada em tomógrafo Philips (Holanda), *multislice* de 6 canais com colimação de alta resolução (cortes finos, de 1 mm de espessura), feitos a cada 10-20 mm, representando cerca de 10% do parênquima pulmonar. As imagens foram reconstruídas espacialmente segundo um algoritmo de alta frequência e foram obtidas segundo protocolo para pesquisa de alterações pulmonares intersticiais. O protocolo incluiu aquisições das imagens em expiração e inspiração em decúbito dorsal e inspiração em decúbito ventral no plano axial, a fim de eliminar artefatos decorrentes de atelectasias gravidade dependentes. Não foi administrado meio de contraste intravenoso. A fim de identificar

e quantificar as lesões tomográficas, foi elaborado um escore semiquantitativo, chamado de **Índice Tomográfico (IT)**:

Para a elaboração do IT foram registradas as seguintes alterações: **opacidades em vidro fosco, faveolamento (“honeycombing”), reticulação fina intralobular, espessamento interlobular e/ou linhas subpleurais e distorções da arquitetura brônquica** (bronquiectasias e/ou bronquioloectasias). A cada alteração foi atribuído um escore numérico de intensidade: ausente = 0, leve=1 moderado = 2 e acentuado = 3, correspondendo à extensão das lesões. Comprometimento de até 20% dos campos pulmonares foi considerado como sendo leve, como moderado se havia entre 20 e 50% de envolvimento dos mesmos e acentuado quando mais de 50 % de área pulmonar estava comprometida. Quanto às alterações da arquitetura brônquica, a presença de bronquioloectasias recebeu valor 1, bronquiectasias foram computadas com valor 2, enquanto à presença de ambas as alterações foi atribuído valor 3, em escala crescente de gravidade. Para o cálculo do IT foi atribuído peso 2 ao espessamento septal interlobular e à reticulação fina intralobular e peso 3 ao faveolamento, com base na sua **relevância em termos de significado fibrótico** (lesão mais grave quanto mais significativa de lesão irreversível), de modo que:

**ÍNDICE TOMOGRÁFICO (IT) = (VIDRO FOSCO) + 3 X (FAVEOLAMENTO) + 2 X (RETICULAÇÃO FINA) + 2 X (ESPESSAMENTO SEPTAL INTERLOBULAR) + (ALT. ARQ. BRÔNQUICA)**

A variação possível do IT foi de 0 a 27. A leitura e interpretação dos resultados foi feita por dois radiologistas experientes em imagenologia das doenças pulmonares intersticiais, sem conhecimento dos dados clínicos dos pacientes. Após as análises, calculou-se a concordância entre os observadores.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estatística descritiva foi utilizada para sumarizar as características demográficas e clínicas dos sujeitos. Variáveis contínuas foram expressas pela média aritmética e desvio padrão ou pela mediana e variação interquartil. Algumas variáveis com distribuição não normal (contagem celular total e eosinófilos no escarro induzido) foram logtransformadas antes da análise de comparação entre grupos. Para as variáveis contínuas, diferenças entre grupos foram avaliadas pelo teste t

de Student ou de Wilcoxon/Mann Whitney e as variáveis categóricas pelo teste do Qui-quadrado. As correlações entre as variáveis foram examinadas por meio dos coeficientes de correlação de Pearson ou de Spearman, conforme apropriado. A concordância entre dois observadores foi aferida pelo coeficiente de correlação intraclasse. O nível de significância aceito foi de 95% e todos os testes foram bicaudados.

Os dados foram analisados utilizando-se o pacote estatístico SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences* for Windows, versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da amostra

Entre dezembro de 2008 e julho de 2011, cinquenta e dois pacientes foram selecionados para o estudo. Um foi excluído por erro nos critérios de inclusão (apresentava pneumoconiose), um retirou o consentimento e três não completaram as visitas dos estudo.

O **grupo controle** foi composto por 38 indivíduos saudáveis, não obesos e não fumantes, com idade média de 49,7 (1,5) anos.

A Tabela 1 mostra as características demográficas e clínicas dos pacientes.

**Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com ES (n=47)**

<i>Características*</i>	<i>% / média(DP)</i>
Idade, anos	49,3 (11,8)
Gênero, feminino %	91,5
Etnia caucasiana %	89,4
Ex-fumantes %	27,7
Duração da doença, anos**	8,1 (7,4)
Fenômeno de Raynaud %	100,0
Escore de Rodnan modificado	11,9 (9,6)
Forma clínica %	
Forma limitada %	68,1
Forma difusa %	31,9
Envolvimento articular %	74,5
Disfunção cardíaca %	38,3
Crise renal %	4,3
FAN positivo %	97,9
ACA +, %	36,2
Anti Scl70 +, %	27,7

\*Os resultados estão expressos como média e desvio padrão para as variáveis contínuas e como percentuais para as variáveis dicotômicas.

\*\*A duração da doença foi calculada como o tempo a partir do primeiros sintoma excluído o fenômeno de Raynaud.

FAN=fator antinuclear; ACA= anticorpos anti-centrômero; Anti-Scl70= anticorpos anti-esclero 70 (topoisomerase); VHS=velocidade de hemossedimentação, valores de referência: 20 mm para mulheres e 10 mm para homens; PCR=proteína C reativa, valores de referência: 3,0 mg/l

Dos 47 pacientes incluídos, 43 (91,5%) eram mulheres, com média (desvio padrão) de idade de 49,2 (11,8) anos. Treze pacientes (27,7%) eram ex-fumantes. Anticorpos anti-Sc170 foram encontrados mais frequentemente em pacientes com a forma difusa (61,5% versus 23,5%,  $p=0,01$ ), ao contrário dos ACA, presentes mais comumente nos pacientes com a forma limitada (94,7% versus 46,4 %,  $p=0,001$ ). Comparando-se as formas clínicas difusa e limitada em relação às demais características clínicas e também às características demográficas, não foram encontradas diferenças significativas na prevalência das mesmas entre os grupos. A exceção foi o escore de Rodnan, que, por definição, foi mais elevado nos pacientes com a forma difusa da ES.

A Tabela 2 apresenta os principais medicamentos utilizados pelos pacientes. A grande maioria (43 pacientes, 91,5%) utilizava bloqueadores de canais de cálcio, inibidores de bomba de prótons (40 pacientes, 85,1%) e estava em uso de imunossupressor (39 indivíduos, 83%). Não houve diferenças em relação à função pulmonar, celularidade do escarro induzido, ILM, alterações tomográficas e dos testes esofágicos quando se comparou pacientes em uso de imunossupressores e glicocorticóides com aqueles sem estes tratamentos.

**Tabela 2. Tratamento medicamentoso utilizado nos pacientes com Esclerose Sistêmica (n=47)**

<i>Medicamentos</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Bloqueadores de canais de cálcio	43	91,5
Inibidores de bomba de prótons	40	85,1
<b><u>Imunossupressores</u></b>	39	83,0
Metotrexato	21	44,7
Ciclofosfamida	9	19,1
Azatioprina	6	12,8
Glicocorticóide*	20	42,6
Procinéticos	15	31,9
Rituximabe	2	4,3

\*Prednisona( doses até 20 mg/dia )

Sintomas digestivos foram referidos por 40 (85,1%) indivíduos (Tabela 3), sendo que sua prevalência foi similar nos pacientes com ou sem anormalidades nos testes de avaliação esofágica. Sintomas respiratórios estiveram presentes em 29 (61,7%) pacientes. Da mesma forma, a prevalência dos sintomas respiratórios não diferiu entre pacientes com ou sem lesões à TCAR ou com ou sem alteração nas provas de função pulmonar.

**Tabela 3. Prevalência de sintomas digestivos e respiratórios nos pacientes com ES (n=47)**

<i>Sintomas</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
<u>Sintomas digestivos</u>		
Regurgitação	39	83,0
Disfagia	29	61,7
Pirose e/ou dor epigástrica	17	36,2
Náuseas e/ou vômitos	17	36,2
<u>Sintomas respiratórios</u>		
Dispnéia	28	59,6
Tosse	18	38,3

#### **4.2 Envolvimento esofágico: resultados da manometria e pHmetria**

A manometria esofágica foi anormal em 37 (78,7%) pacientes, dos quais 27 (57,4%) apresentaram aperistalse. Vinte e sete (57,4%) pacientes tiveram ondas peristálticas inefetivas. Hipotonia do EIE foi encontrada em 18 (38,2%) e do ESE em 7 (14,8%) pacientes (Tabela 4).

**Tabela 4. Anormalidades da manometria e PHmetria esofágica nos pacientes com ES (n=47)**

<i>Anormalidade</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Aperistalse parcial (terços distais)	19	40,4
Aperistalse Total	08	17,0
Ondas peristálticas inefetivas	27	57,4
Hipotonia do EIE	18	38,2
Hipotonia do ESE	07	14,8
Qualquer alteração manométrica	29	61,7
RGE patológico (DeMeester $\geq$ 15)	33	70,2
RGE moderado a grave (DeMeester $\geq$ 32)	22	46,8
Tempo de exposição ácida $>4\%$	30	63,6
Episódios de refluxo $> 47$	05	10,6
Envolvimento esofágico acentuado*	32	68,1

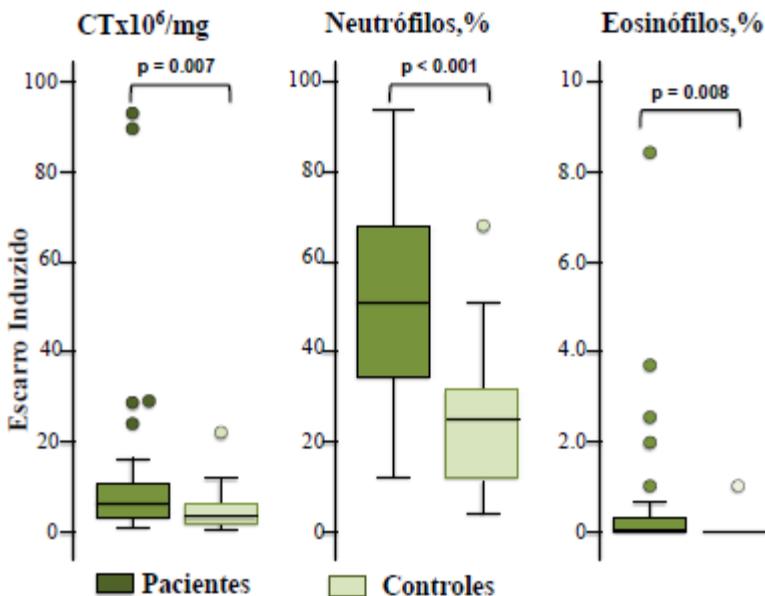
EIE: esfíncter inferior do esôfago; ESE: esfíncter superior do esôfago; \*manometria anormal e/ou RGE moderado a grave.

Trinta e três (70,2%) pacientes tinham RGE patológico (escore de DeMeester  $> 15$ ). RGE patológico moderado a grave (escore de DeMeester  $\geq 32$ ) ocorreu em 22 (46,8%) os pacientes. Trinta indivíduos (63,8%) tiveram tempo de exposição ácida no esôfago distal anormal e somente 5 (10,6%) apresentaram número aumentado de episódios de refluxo. Combinando os resultados da manometria e pHmetria, verificamos que 32 pacientes (68,1%) tinham envolvimento esofágico acentuado (manometria anormal e/ou RGE moderado a grave, com DeMeester  $\geq 32$ ) (Tabela 4).

#### **4.3 Comprometimento das vias aéreas: resultados do escarro induzido e do teste de responsividade brônquica**

A contagem celular total (CT) [5,9 (7,4) vs 3,5 (4,1)  $\times 10^6$ ,  $p=0,01$ ], e o percentual de neutrófilos [50,8 (22,9) vs 25,0 (16,5)  $\times 10^6$ ,  $p < 0,0001$ ] e de eosinófilos [0,49 (1,3) vs 0,10 (0,3),  $p=0,007$ ] foram

significativamente maiores nos pacientes em comparação aos controles. (Gráfico 1).



**Gráfico 1. Contagem Celular Total (CT) e percentual de neutrófilos e eosinófilos no escarro induzido dos pacientes com ES (n=47) e dos controles (n=38)**

Índice lipídico de macrófagos (ILM)  $\geq 7$  (microaspiração) foi encontrado em 44 (93,6%) dos pacientes,  $\geq 50$  (microaspiração significativa) em 20 pacientes (42,6%) e  $\geq 100$  em 10 pacientes (21,3%).

A Tabela 5 contém os resultados do escarro induzido de pacientes ex-tabagistas comparados com aqueles que nunca fumaram. Ao contrário da celularidade total e da contagem de neutrófilos e eosinófilos, o ILM foi mais elevado nos pacientes ex-fumantes [84,5 (50,2) versus 37,5 (123,0),  $p=0,04$ ].

**Tabela 5: Resultados do escarro induzido de acordo com tabagismo prévio nos pacientes com ES (n=47)**

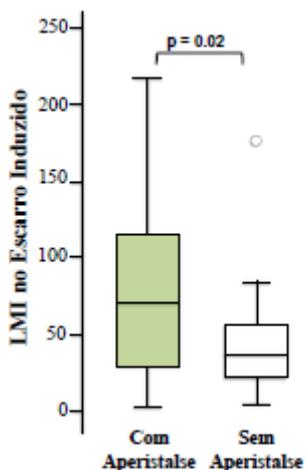
<i>Características do escarro induzido</i>	<i>Nunca Fumou (n=34)</i>	<i>Ex- tabagista (n=13)</i>	<i>Valor p</i>
CCTx10 <sup>6</sup> /mg	6,6 (1,8;16,1)	4,7 (1,6;75,2)	0,90
Neutrófilos%	52,0 (16,8;85,8)	41,0 (14,8;85,5)	0,70
Eosinófilos%	0 (0;1,3)	0 (0;1,9)	0,60
Macrófagos%	40,0 (15,2;67,0)	48,0 (11,6;83,9)	0,40
Linfócitos%	1,6 (0,1;5,0)	2,3 (0,3;12,3)	0,40
ILM	37,5 (8,6;137,85)	84,0 (22,2;195)	0,04

ILM: índice lipídico de macrófagos; % (IC 95%)

O teste de responsividade à metacolina foi positivo, caracterizando hiperresponsividade brônquica (HB), ( $PC_{20} < 8,0$ ; variando de 0,03 a 5,9) em 13 (27,7%) pacientes e em nenhum dos controles ( $p < 0,0001$ ). Pacientes com HB foram similares aos sem HB com relação à idade e à contagem de eosinófilos no escarro induzido e também não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação às demais características clínicas, incluindo tabagismo prévio, características funcionais pulmonares ou radiológicas.

#### **4.4 Associações entre as alterações esofágicas os resultados do escarro induzido**

O ILM foi significativamente mais elevado nos pacientes com aperistalse total ou parcial (mediana /variação interquartil) [67,5 (92,7) *versus* 38,5 (35,5),  $p=0,02$ ] (Gráfico 2). Dentre os pacientes com aperistalse esofágica, foi encontrado maior percentual de indivíduos com  $ILM \geq 100$  (34,0 % vs 5,6%,  $p=0,02$ ) e os pacientes com alguma anormalidade manométrica tenderam a ter maior proporção de indivíduos com  $ILM \geq 100$  (31,0% vs 10,0%,  $p=0,06$ ). Dentre os pacientes com  $ILM \geq 50$ , 80% tinha anormalidades manométricas esofágicas ( $p=0,07$ ).



**Gráfico 2.** Índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido de acordo com a presença de aperistalse esofágica nos pacientes com ES (n=47).

#### 4.5 Envolvimento Pulmonar: resultados das provas funcionais pulmonares

A Tabela 6 mostra os parâmetros funcionais pulmonares médios dos pacientes (valores espirométricos, pletismográficos e da  $D_{LCO_{NA}}$ ) e dos controles (valores espirométricos). Comparados aos controles, os pacientes apresentaram valores espirométricos significativamente reduzidos em relação à CVF [89,68 (19,49) vs 101,37 (11,63),  $p=0,001$ ] e ao  $VEF_1$  [87,28 (18,04) vs 97,34 (11,24),  $p=0,002$ ], mas similares em relação ao  $VEF_1/CVF$  ( $p=0,210$ ).

**Tabela 6. Parâmetros funcionais pulmonares dos pacientes com ES (n=47) e dos Controles (n=38)**

<u>Parâmetros Funcionais Pulmonares</u>	<i>Pacientes (n=47)</i>	<i>Controles(n=38)</i>	<i>p</i>
VEF <sub>1</sub> , % do previsto	86,3 (18,5)	97,34 (11,24)	0,002
CVF, % do previsto	89,4 (19,1)	101,37 (11,63)	0,001
VEF <sub>1</sub> /CVF, % do previsto	80,0 (07,1)	78,9(4,1)	0,210
CPT, % do previsto	98,6 (21,4)	-	-
VR, % do previsto	119,3 (36,1)	-	-
D <sub>LCO/VA</sub> , % do previsto	68,3(19,0)	-	-
Teste de broncoprovocação com metacolina***, %	27,7	0,0	0,0001

\*\*\*VEF<sub>1</sub> =volume expiratório forçado em um segundo; CVF =capacidade vital forçada; CPT = capacidade pulmonar total; VR= volume residual; D<sub>LCO/VA</sub> = difusão do monóxido de carbono corrigida pelo volume alveolar; \*\*\* = PC<sub>20</sub> <8.0 mg/ml.

A espirometria foi anormal em 21(48,9%) pacientes. Onze (23,4%) apresentaram padrão restritivo, e 10 (21,3%) tiveram padrão de leve obstrução. Não foram encontradas diferenças na função pulmonar entre os pacientes ex-tabagistas e aqueles que nunca fumaram. Considerando somente os pacientes com TCAR anormal, foram encontrados nove (37,5%) com padrão restritivo e três (12,5%) com padrão obstrutivo. O padrão restritivo foi significativamente mais comum nos pacientes com TCAR anormal (81,8% vs 18,2%, p=0,04) enquanto que o padrão obstrutivo foi mais frequente nos pacientes com TCAR normal (30,4% vs 8,7%, p=0,04). Vinte e três (48,9%) indivíduos apresentaram redução da D<sub>LCO/VA</sub> (< de 80% do previsto), que também não apresentou associação com ex-tabagismo (Tabela 7).

**Tabela 7. Anormalidades da Função Pulmonar nos pacientes com ES (n=47)**

<i>Alteração Funcional Pulmonar</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
<b>Padrão restritivo*</b>	<b>11</b>	<b>23,4</b>
<b>Padrão obstrutivo**</b>	<b>10</b>	<b>21,3</b>
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>44,6</b>
<b>Redução da D<sub>LCOVA</sub>***</b>	<b>23</b>	<b>48,9</b>

\*\*\*\*Padrão restritivo: CPT abaixo de 80% do previsto; \*\*Padrão obstrutivo: VEF<sub>1</sub>/CVF abaixo do percentil 5% do previsto; D<sub>LCOVA</sub> = difusão do monóxido de carbono, ajustada para o volume alveolar.

#### **4.6 Envolvimento pulmonar intersticial: resultados da TCAR**

Vinte e quatro pacientes (51,0%) tiveram anormalidades tomográficas (IT $\geq$ 3), sendo que opacidade em vidro fosco foi a alteração mais frequentemente observada (Tabela 8), ocorrendo em quase todos os casos. Já as alterações fibróticas estabelecidas, como faveolamento, padrão de reticulação e alterações da arquitetura brônquica ocorreram em um terço, metade e um quarto dos casos, respectivamente. A média (DP) do escore tomográfico (IT) foi de 4,83 (5,85), variando de 0 a 18.

**Tabela 8. Alterações tomográficas nos pacientes com ES e envolvimento pulmonar à TCAR\*(n=24)**

<i>Alterações Tomográficas</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Opacidades em vidro fosco	23	95,8
Reticulação fina intralobular	12	50,0
Espessamento septal intralobular	11	45,8
Alterações da estrutura brônquica		
bronquioloectasias	08	25,0
bronquiectasias	04	16,7
ambas	06	25,0
Faveolamento	08	33,3

\*TCAR: Tomografia Computadorizada de Alta Resolução

A extensão das anormalidades tomográficas está demonstrada na Tabela 9. Não estão listadas as alterações da arquitetura brônquica,

pois sua extensão em termos de área pulmonar acometida não foi considerada, mas apenas sua presença.

**Tabela 9: Anormalidades tomográficas em relação ao percentual de área pulmonar comprometida nos pacientes com ES e envolvimento pulmonar à TCAR\* (n=24)**

<i>Área pulmonar acometida (%)</i>	<i>Até 20%</i>	<i>20 a 50%</i>	<i>Mais de 50%</i>
Opacidades em vidro fosco	14,9	21,3	12,8
Reticulação fina intralobular	14,9	08,5	02,1
Espessamento septal intralobular	14,9	08,5	00,0
Faveolamento	17,0	00,0	00,0

\*TCAR: Tomografia Computadorizada de Alta Resolução

Comparando-se os pacientes com TCAR normal com aqueles com TCAR anormal ( $IT \geq 3$ ), verificou-se que ambos os grupos apresentaram características demográficas e clínicas semelhantes, similar porcentagem de indivíduos ex-fumantes, pacientes com envolvimento visceral e de modalidades terapêuticas utilizadas.

No entanto, os pacientes com TCAR anormal tiveram predominância da forma difusa, escore de Rodnan mais elevado e maior positividade de anti-Scl70. Além disso, esses pacientes apresentaram CVF e CPT médias reduzidas. (Tabela 10).

**Tabela 10. Características clínicas e funcionais dos pacientes com ES de acordo com a presença de anormalidades à TCAR\*(n=47)**

<u>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</u>	TCAR +	TCAR-	p**
Idade, anos	52,0 (12,4)	46,3 (10,6)	ns
Gênero feminino%	91,5	87,5	ns
Ex-fumantes %	29,2	26,1	ns
Duração da doença, anos	08,0 (7,4)	08,0 (7,9)	ns
Escore cutâneo de Rodnan modificado	15,1 (11,3)	08,4 (5,9)	0,01
Forma clínica %			
Limitada	45,8	87,0	0,003
Difusa	54,2	13,0	0,003
Envolvimento esofágico**	50,0	50,0	ns
ILM ≥ 50	30,0	70,0	ns
ILM ≥ 100	55,0	45,0	ns
Sintomas digestivos	83,3	87,0	ns
Sintomas respiratórios	62,5	60,9	ns
Envolvimento cardíaco	39,1	51,7	ns
Crise renal	04,3	04,2	ns
Anti-centrômero positivo%	25,0	56,5	0.02
Anti Scl70 positivo, %	50,0	04,3	<0.0001
Imunossupressores %	79,2	87,0	ns
Prednisona, %	54,2	30,4	ns
VHS aumentado	18,2	20,8	ns
PCR aumentada	20,8	17,4	ns
<b>CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS PULMONARES</b>			
VEF <sub>1</sub> , % do previsto	83,4 (20,9)	90,4 (12,1)	ns
CVF, % do previsto	83,6 (18,3)	96,3 (15,7)	0,01
VEF <sub>1</sub> /CVF, % do previsto	80,9 (08,4)	79,0 (05,8)	ns
CPT, % do previsto	89,9 (19,2)	107,6 (20,4)	0,005
VR, % do previsto	112,0 (30,5)	124,0 (41,0)	ns
D <sub>LCOVA</sub> , % do previsto	66,5 (20,7)	70,8 (17,5)	ns
Teste metacolina positivo†, %	20,8	34,8	ns

Legenda:

\*TCAR: Tomografia Computadorizada de Alta Resolução

\*\* Envolvimento esofágico: manometria e/ou pHmetria anormais

#ILM: Índice Lipídico de Macrófagos

VEF<sub>1</sub> volume expiratório forçado em um segundo

CVF =capacidade vital forçada.

CPT = capacidade pulmonar total

† = PC<sub>20</sub> <8.0 mg/ml

#### 4.7 Associações entre as anormalidades esofágicas, alterações de função pulmonar e da TCAR

A Tabela 11 mostra os parâmetros funcionais os achados à TCAR (IT) em relação à presença de envolvimento esofágico acentuado (presença de anormalidades esofágicas e/ou RGR moderado ou grave)

**Tabela 11. Parâmetros funcionais e anatômicos (TCAR) pulmonares de acordo com a presença de envolvimento esofágico acentuado##**

Parâmetro pulmonar <sup>#</sup>	<u>Envolvimento esofágico</u>		Valor p
	<u>acentuado</u> <sup>##</sup>		
	<i>Presente</i>	<i>Ausente</i>	
CVF	89,3(18,8)	90,9(17,1)	0,77
CPT	98,8(27,7)	98,8(16,0)	0,99
VR	119,1(38,3)	115,3(32,0)	0,73
Hiperresponsividade brônquica <sup>*</sup> %	28,1	24,7	0,91
D <sub>LCO/VA</sub>	65,6(19,9)	76,8(14,2)	<b>0,05</b>
<b>Índice Tomográfico</b>	6,03(6,29)	2,27(3,82)	<b>0,03</b>

# Valores expressos em média(DP), % do previsto, exceto para a Hiperresponsividade Brônquica. CVF: capacidade vital forçada; CPT: capacidade pulmonar total; VR: volume residual; D<sub>LCO/VA</sub>: difusão de monóxido de carbono corrigida pelo volume alveolar; Hiperresponsividade brônquica: \*PC<sub>20</sub><8,0;

## Envolvimento esofágico acentuado: anormalidades à manometria e/ou presença de RGE moderado ou grave à pHmetria.

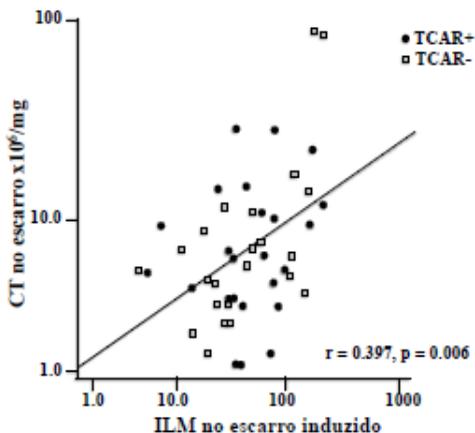
A D<sub>LCO/VA</sub> média (% do previsto) tendeu a ser menor nos pacientes com envolvimento esofágico acentuado [76,8 (14,2) *versus* 65,6 (19,9), p=0,05 e o IT médio foi significativamente mais elevado nestes pacientes [2,27(3,82) *versus* 6,03(6,29), p=0,03].

O IT médio (DP) também foi mais elevado em pacientes com dismotilidade esofágica (ondas peristálticas inefetivas): [6,89(6,45)

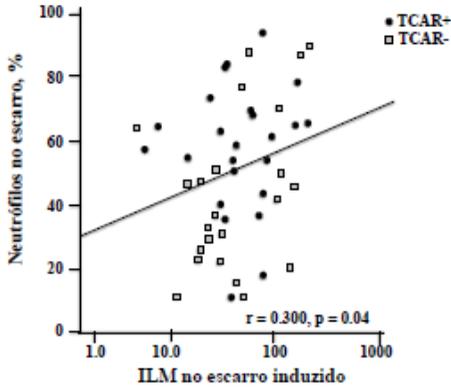
versus 2,0(3,4),  $p=0,01$ ]. O IT apresentou correlação inversa com a pressão média do EIE ( $r= -0,43$ ,  $p=0,005$ ).

#### 4.8 Correlações entre a celularidade do escarro induzido e o Índice Lipídico de Macrófagos e entre o Índice Lipídico de Macrófagos e a função pulmonar

Encontrou-se uma correlação positiva entre o ILM e a CT  $\times 10^6/g$  ( $r= 0,397$ ,  $p = 0,006$ ), (Gráfico 3). Também foi encontrada correlação positiva entre o ILM e a contagem de neutrófilos ( $r=0,300$ ,  $p=0,04$ ) no escarro induzido (Gráfico 4).

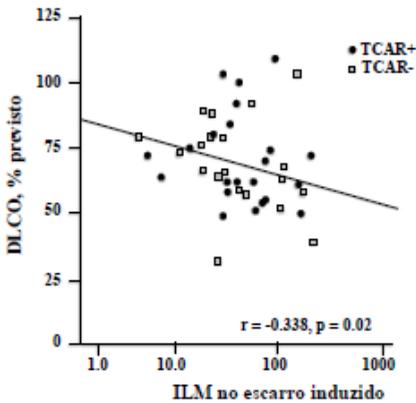


**Gráfico 3.** Correlação entre a contagem celular total (CT) e o índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido dos pacientes com ES (n=47)



**Gráfico 4.** Correlação entre percentual de neutrófilos e índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido dos pacientes com ES (n=47).

Além disso, foi também verificada uma correlação inversa entre o índice lipídico e os níveis da  $D_{LCO/VA}$  ( $r=0,338$ ,  $p=0,02$ ), Gráfico 5.



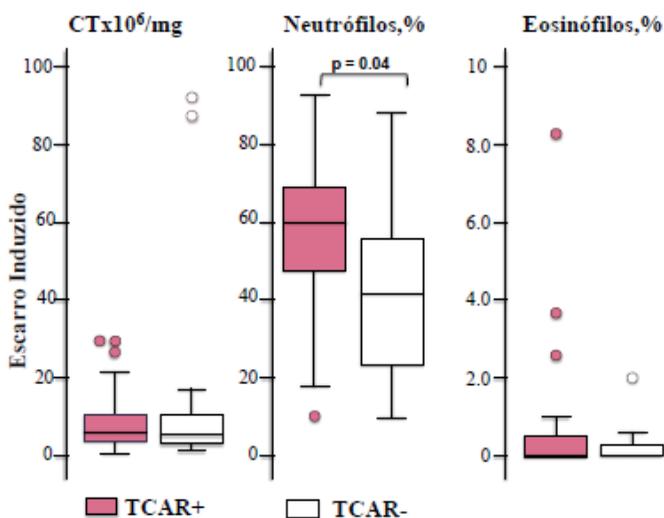
**Gráfico 5.** Correlação entre o índice lipídico de macrófagos (ILM) no escarro induzido e os níveis de  $D_{LCO/VA}$  nos pacientes com ES (n=47).

#### 4.9 Associação entre as alterações tomográficas e os resultados do escarro induzido

Pacientes com TCAR anormal ( $IT \geq 3$ ) tiveram uma contagem de neutrófilos, mas não de eosinófilos, linfócitos ou CT, significativamente maior do que aqueles com TCAR normal [(mediana (variação interquartil) 61,6 (24,6) *versus* 41,6 (41,3),  $p=0,04$ ] (Gráfico 6).

Não foram encontradas associações entre a presença de alterações à TCAR ( $IT \geq 3$ ) e o ILM, nem entre cada tipo de alteração tomográfica analisada separadamente e o ILM (microaspiração). O ILM não apresentou correlação com o IT.

Os resultados do teste de broncoprovocação com metacolina não mostraram nenhuma correlação com a função pulmonar nem com as alterações à TCAR.



**Gráfico 6.** Contagem celular total (CT) e diferencial (percentual de neutrófilos e de eosinófilos) do escarro induzido de acordo com a presença de anormalidades à TCAR nos pacientes com ES (n=47).



## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados diversos aspectos clínicos, tomográficos e funcionais de 47 pacientes com ES sem evidências de hipertensão pulmonar. Os resultados da avaliação do comprometimento pulmonar e das vias aéreas foram analisados em relação ao envolvimento esofágico. Nossos resultados demonstram que a ocorrência de microaspiração é comum nesses pacientes, sugerindo que esta pode estar envolvida na fisiopatogênese da lesão pulmonar. Na ES, a dismotilidade esofágica e o RGE patológico são frequentes e acredita-se que possa levar a microaspiração. Entretanto, até o presente, nenhum estudo forneceu evidências diretas de microaspiração nos pulmões de pacientes com ES. O presente estudo acrescenta aos dados da literatura evidências de associação entre microaspiração e envolvimento pulmonar nestes pacientes. Isto é relevante porque, sendo um fenômeno comum nestes pacientes, a microaspiração deverá futuramente ser alvo de estratégias terapêuticas mais específicas.

Uma limitação de nosso estudo é o desenho transversal, que não permite concluir sobre causalidade. Contudo, tivemos por objetivo explorar associações e não causalidade, o que deverá ser posteriormente investigado em estudo longitudinais. É improvável que os resultados do escarro induzido tenham sido influenciados pelo uso de corticosteróides e/ou imunossuppressores, uma vez que apenas cinco pacientes não estavam em uso de nenhum destes tratamentos. Além disso, não houve diferenças nos resultados quando analisados comparativamente em relação aos diferentes tratamentos anti-inflamatórios. Por outro lado, os pontos fortes do estudo, que incluem o tamanho da amostra, a caracterização funcional e tomográfica do envolvimento pulmonar, a documentação adequada das anormalidades esofágicas e o emprego de métodos padronizados e validados para investigar a inflamação das vias aéreas e microaspiração, conferem robustez aos resultados.

As características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos no presente estudo são similares àquelas da maioria das coortes de pacientes com ES incluídas em estudos clínicos realizados em diferentes países e continentes e também no Brasil (7, 10, 211-214). Porém, em relação a uma série de 58 pacientes brasileiros (214), apesar da porcentagem similar de mulheres e de duração comparável de doença, verificamos que os mesmos apresentaram maior frequência (cerca de 60%) da forma difusa da doença, em comparação com cerca de 30% dos nossos pacientes. Aquela série de pacientes provenientes da Bahia incluiu quase 80% de indivíduos de etnia negra, enquanto a nossa série,

como era de se esperar por se tratar do sul do Brasil, foi composta por mais de 80% de indivíduos caucasianos. Este dado pode estar relacionado ao que os estudos epidemiológicos tem apontado, que nas mulheres negras a doença tende a ser mais grave e com maior frequência da forma difusa <sup>(7)</sup>. Nossa amostra também é similar ao relatado na literatura em relação à prevalência de envolvimento musculoesquelético <sup>(215)</sup> nas séries de pacientes de outros países, sendo este comprometimento de modo geral bastante comum nos pacientes com ES. Quanto ao envolvimento cardíaco, nossa prevalência foi mais elevada em comparação com uma série européia <sup>(212)</sup> e similar à outra, somente com pacientes da Espanha <sup>(216)</sup>, porém devem ser levadas em conta as diferenças nas anormalidades consideradas. Em nossos pacientes, o envolvimento cardíaco foi quase sempre subclínico, sem comprometimento funcional significativo. No que se refere ao perfil de autoanticorpos em relação às formas clínicas, o mesmo foi observado de acordo com o esperado em pacientes com ES <sup>(87)</sup>, sendo o ACA associado com a forma limitada e o anti-Scl70 com a forma difusa da doença.

Quanto ao envolvimento esofágico, verificamos que o esôfago foi o órgão mais frequentemente acometido na nossa casuística, conforme os resultados da manometria e pHmetria. Cerca de 70% dos pacientes apresentaram alterações na pHmetria esofágica, com presença de RGE patológico. Esta prevalência é similar ao que consta na literatura, que situa a frequência de acometimento esofágico e de RGE patológico entre 50 e 90% dos casos <sup>(103)</sup>. Na manometria, conforme o esperado, foi encontrada mais frequentemente aperistalse nos terços inferiores do esôfago. Hipotonia do EIE foi observada em mais de um terço dos pacientes, assemelhando-se ao registrado na literatura <sup>(217)</sup>. Quanto à pHmetria, a maioria (cerca de 60%) dos pacientes apresentavam tempo prolongado de exposição ácida no esôfago distal. Diagnóstico de RGE patológico, medido pelo escore de DeMeester acima do limite da normalidade, foi bastante frequente em nossa casuística, tendo sido encontrado em cerca de 70% dos pacientes, sendo que pouco menos da metade (46%) tinha DeMeester igual ou superior a 32, o que foi considerado como envolvimento esofágico acentuado. Segundo a literatura, a prevalência de anormalidades à pHmetria na ES situa-se entre 54 a 86% dos casos <sup>(103, 107)</sup>. No entanto, não há um consenso em relação ao que é considerado envolvimento esofágico ou RGE significativos, o que dificulta as comparações entre as casuísticas em termos de prevalência de RGE patológico na ES. A maioria dos nossos pacientes referiu sintomas digestivos, sendo grande a frequência

de regurgitação e de disfagia. No entanto, a dor epigástrica e/ou pirose foi relatada por apenas um terço deles. A exemplo do observado em relação aos sintomas respiratórios, não encontramos correlação entre a presença dos sintomas e alterações nos testes esofágicos, o que tem sido previamente relatado em pacientes com ES, nos quais os sintomas digestivos são um pobre indicador da presença de envolvimento esofágico <sup>(108-109)</sup>.

O diagnóstico do envolvimento pulmonar intersticial é feito principalmente com a utilização do teste padrão ouro, que é a TCAR. Com o objetivo de quantificar, ou seja, avaliar a extensão e a gravidade da pneumopatia intersticial na ES e classificar os pacientes de modo uniforme nos estudos clínicos, diversos escores tem sido desenvolvidos. Um dos primeiros foi desenvolvido por Wells e cols. em 1992 <sup>(218)</sup>, que atribuiu uma pontuação crescente de acordo com a presença de cada lesão, se inflamatória ou fibrótica, do mesmo modo que foi feito no presente estudo e também quantificou sua extensão em cinco áreas pulmonares. Já o escore de Warrick e colaboradores <sup>(136)</sup>, um dos mais utilizados em estudos clínicos, atribui pontuação crescente às lesões de acordo com seu significado fibrótico e que, somado a um número advindo da quantidade de segmentos pulmonares acometidos por cada lesão, resulta em um número final que reflete simultaneamente gravidade e extensão das lesões. Outros escores consideram separadamente o grau de fibrose e a extensão das lesões, como o de Bellia e cols. <sup>(219)</sup>, que adaptaram o escore de Warrick nesse sentido, produzindo dois números, os chamados índices de alveolite e de fibrose. Para a análise das tomografias deste estudo, decidimos elaborar um escore de alterações tomográficas, que chamamos de IT. Isto foi motivado pelo fato de não haver consenso em relação ao melhor método de quantificação da extensão e gravidade das alterações tomográficas. Ademais, os escores elaborados pelos diversos autores são de modo geral complexos e demandam tempo considerável em sua utilização, além de carecerem de estudos de validação. Nosso escore, por outro lado, é de simples e relativamente rápida execução, avaliando simultaneamente a gravidade e a extensão das anormalidades tomográficas. Ele foi elaborado em conjunto com os radiologistas que fizeram a leitura das tomografias de nossos pacientes e está em processo de validação que deve anteceder sua utilização na prática clínica.

Cerca de metade dos pacientes estudados apresentou envolvimento pulmonar intersticial, considerado como a presença de alterações compatíveis à TCAR, em nosso estudo definido como  $IT \geq 3$ . Este ponto de corte foi estabelecido a fim de permitir que pacientes com

alterações mínimas não fossem incluídos como tendo envolvimento pulmonar intersticial, considerando que a literatura relata que a grande maioria dos pacientes com ES apresenta algum grau de anormalidades pulmonares à TCAR <sup>(118, 134)</sup>, mas a prevalência de envolvimento intersticial clinicamente significativo varia entre 25% <sup>(220)</sup> e 40% <sup>(119)</sup>.

Dentre nossos pacientes com TCAR anormal, pouco menos da metade apresentava alterações espirométricas e cerca de metade deles tinha redução nos níveis da DLCO. Por outro lado, cerca de metade dos pacientes com TCAR normal também tinha redução nos níveis da DLCO. Por outro lado, a CVF e a CPT foram significativamente menores nos pacientes com TCAR alterada. Este achado pode ser relacionado ao fato de que a DLCO é considerada um teste mais sensível na avaliação da função pulmonar na ES e sua alteração poderia refletir a presença de anormalidades vasculares incipientes ou uma alteração funcional já decorrente do envolvimento intersticial mínimo (IT >0 e <3) em alguns pacientes. Sintomas respiratórios, incluindo dispnéia e tosse, não foram mais prevalentes nos pacientes com TCAR alterada. Este fato se explica pelo fato de que, na ES, o envolvimento pulmonar intersticial costuma ser insidioso e lentamente progressivo, exceto nos casos mais graves de doença difusa com rápida progressão, assim o quadro é geralmente assintomático até os estágios mais avançados da doença <sup>(118)</sup>. Também em conformidade com os dados da literatura, doença pulmonar intersticial foi mais frequente nos nossos pacientes com a forma difusa e com positividade para o anti-Sc170 <sup>(87, 89, 156)</sup>.

Os achados tomográficos mais frequentes em nossa casuística foram a atenuação em vidro fosco, assim como na maioria dos relatos presentes na literatura <sup>(125, 130, 221)</sup> e que ocorreram em quase todos os pacientes com envolvimento pulmonar intersticial de nossa casuística. Já a série de casos de pacientes brasileiros <sup>(214)</sup> relata prevalência bem maior (80%) de faveolamento e menor de opacidades em vidro fosco (66%) em relação à nossa, refletindo a maior gravidade do envolvimento pulmonar daqueles pacientes em relação aos nossos. Reticulação fina intralobular ocorreu em metade dos nossos casos e o faveolamento ocorreu em cerca de um terço deles. As anormalidades da arquitetura brônquica foram observadas em um quarto dos pacientes com TCAR alterada. Com exceção das opacidades em vidro fosco, que em pouco mais de 10% dos casos era difusa, a grande maioria das alterações tomográficas estava restrita a até 20% da área pulmonar. Estes achados demonstram que a maioria dos nossos pacientes apresentavam, de modo geral, envolvimento pulmonar intersticial leve a moderado, com predomínio de alterações inflamatórias sobre as fibróticas, consistente

com o padrão predominante de PINE. Isto pode explicar a relativamente baixa prevalência de alterações espirométricas encontradas, especialmente do padrão restritivo característico da pneumopatia intersticial, o qual foi observado em pouco mais de 20% dos casos com TCAR alterada. Além disso, a média e a mediana do escore tomográfico (IT) que quantificou a extensão do envolvimento pulmonar foram baixas, abaixo de cinco. No entanto, mesmo com este comprometimento limitado, os valores médios da CVF e da CPT foram significativamente menores nos pacientes com TCAR anormal em relação àqueles com TCAR normal, indicando que mesmo alterações tomográficas limitadas podem resultar em comprometimento da função pulmonar.

Nossos pacientes apresentaram um padrão inflamatório no escarro induzido, com maior porcentagem de neutrófilos e eosinófilos em comparação aos controles. Este método, que tem se firmado como uma ferramenta muito útil na avaliação clínica e pesquisa de doenças respiratórias, principalmente a asma <sup>(142)</sup>, tem sido pouco utilizada na ES. Nossos resultados são similares aos de Damjanov e cols. <sup>(150)</sup>, que compararam escarro induzido e LBA em pacientes com ES. Outro estudo bem recente também encontrou o mesmo padrão inflamatório no escarro induzido em pacientes com ES <sup>(151)</sup>, sem associação com a presença de envolvimento intersticial. Os autores sugeriram que este achado poderia ser indicativo de inflamação pulmonar latente e subclínica. Em nosso estudo, apesar de não termos encontrado associações diretas entre o ILM (microaspiração) e as alterações tomográficas, observamos que a inflamação neutrofílica das vias aéreas associou-se com a presença de envolvimento pulmonar intersticial, levantando a hipótese de que a mesma possa refletir a presença da inflamação no interstício, ainda que talvez em fase incipiente. Neste caso, o escarro induzido seria uma forma de acessar de modo não invasivo o processo inflamatório pulmonar, o que forneceria subsídios para a abordagem terapêutica mais adequada naquele momento. Estudos longitudinais e com amostras maiores são necessários para testar esta hipótese.

Ao longo de várias décadas, tem sido motivo de controvérsia a possível relação causal entre envolvimento esofágico e pulmonar na ES, baseada na hipótese de que as alterações esofágicas, importantes e frequentes nessa população, poderiam levar a microaspiração recorrente do conteúdo digestivo, causando ou agravando lesões pulmonares intersticiais <sup>(175-177, 183)</sup>. A associação entre estes acometimentos tem sido documentada em muitos estudos <sup>(175-176, 178-181)</sup>, porém alguns tem apresentado evidências em contrário <sup>(177, 183)</sup>. Nós observamos que os

pacientes com envolvimento esofágico acentuado (alterações manométricas e/ou RGE moderado a grave), tinham tendência a apresentar redução nos níveis de  $D_{LCO}$ . Marie e cols. (178) demonstraram que pacientes com anormalidades manométricas mais graves apresentavam mais lesões pulmonares fibróticas, menores níveis de  $D_{LCO}$  e pior função pulmonar após dois anos de acompanhamento. Além disso, o presente estudo demonstra que a magnitude das alterações intersticiais pulmonares, medidas pelo IT, são mais significativas em pacientes com ondas peristálticas ineficazes e que os pacientes com aperistalse tenderam a apresentar IT mais elevado. Adicionalmente, também observamos que o IT foi mais elevado em pacientes com alterações da manometria esofágica e/ou RGE moderado a grave (envolvimento esofágico acentuado) e que houve uma correlação inversa entre o IT e a pressão do ESE. Um estudo publicado por Savarino e cols. (180), utilizando impedanciometria, uma nova e mais sensível técnica para a detecção de RGE, não demonstrou maior prevalência de anormalidades à manometria esofágica em pacientes com ES e envolvimento pulmonar intersticial significativo em comparação àqueles sem este acometimento. No entanto, os primeiros apresentavam maior número de episódios de RGE ácido e não ácido atingindo o esôfago proximal, achados diferentes daqueles aqui apresentados. Em nosso estudo, não se observou associação entre a presença de alterações tomográficas e anormalidades à pHmetria, porém verificou-se que os pacientes com envolvimento esofágico acentuado tiveram tendência a apresentar menores níveis de  $D_{LCO}$ . As diferenças entre os achados de nosso estudo e o de Savarino e cols. podem ser devidas principalmente às diferenças entre os métodos utilizados para a medida do RGE, pois a pHmetria detecta apenas o refluxo ácido, enquanto que a impedanciometria é capaz de identificar também o refluxo não ácido. Além disso, a população estudada por aqueles autores apresenta diferenças em relação à nossa, especialmente em relação à magnitude do envolvimento pulmonar intersticial e esofágico, a julgar pelo fato de que nenhum dos pacientes incluídos estava sendo tratado com imunossuppressores, bloqueadores dos canais de cálcio ou drogas contra DRGE, além de menor frequência de anormalidades manométricas em comparação à nossa casuística.

A despeito dos diversos dados publicados na literatura favorecendo a hipótese de associação entre envolvimento esofágico e pulmonar tanto na ES quanto na FPI, uma recente revisão sistemática (184) avaliou a relação entre as pneumopatias intersticiais e a DRGE.

Foram incluídos 22 artigos, sendo 14 sobre FPI (10 com nível de evidência científica B e quatro com nível C), quatro estudos em ES (com nível B) e dois em doença mista do tecido conectivo (DMTC), ambos com nível C de evidência. Os autores concluíram que, apesar de associação entre envolvimento esofágico e pulmonar ter sido bem documentada, tanto na ES como na FPI <sup>(165, 222)</sup>, uma relação de causalidade entre os mesmos não pode ser estabelecida com segurança, pois a microaspiração não tem sido objetivamente demonstrada. Além disso, o envolvimento dos dois sistemas na ES, pulmonar e esofágico, poderia ser simultâneo e apenas refletir o grau de evolução da doença, em uma condição que afeta frequentemente a ambos. Os autores concluem que, em relação à FPI, DGER é mais comum nesses pacientes do que na população geral, mas não há como definir a relação de causalidade entre estes fatores. Além disso, há escassas evidências em relação ao efeito da terapia antirefluxo na progressão da FPI. Na ES, envolvimento esofágico e pulmonar são comuns, sendo a associação entre estes acometimentos demonstrada em alguns estudos, porém não em outros, sem também estabelecer uma relação causal entre eles. A conclusão final é de que apenas estudos adequadamente desenhados e com maior poder estatístico poderão responder a essa questão, permanecendo o assunto ainda bastante controverso.

A demonstração objetiva da microaspiração é difícil, pois não existe um teste padrão ouro para o seu diagnóstico. A pesquisa de lipídios no citoplasma de macrófagos realizada geralmente no LBA tem sido empregada como um método para demonstrar o processo de microaspiração em pneumonias aspirativas <sup>(191-192)</sup>. Também no escarro induzido, Parameswaran et al. <sup>(196)</sup> demonstraram que, em asmáticos com RGE, o ILM, conforme descrito por Corwin e Irvin <sup>(190)</sup>, apresentava um bom poder discriminativo como indicador de possível aspiração gástrica quando encontrado acima do ponto de corte definido em sete. Nossos pacientes foram selecionados cuidadosamente em relação à exclusão de eventuais condições respiratórias que pudessem alterar o resultado do ILM, como a presença de pneumonia lipoídica, proteinose alveolar, doença de depósito de lipídios ou tromboembolismo gorduroso.

Outro aspecto que deve ser considerado na avaliação do ILM é o tabagismo. Um estudo de Wilson e colaboradores relatou que o ILM, avaliado pela mesma metodologia descrita acima, foi mais elevado em pacientes com sintomas respiratórios sem outras doenças, fumantes e ex-fumantes <sup>(223)</sup>, em comparação aos que nunca fumaram. Nós também

verificamos que o ILM foi mais elevado nos nossos pacientes que eram ex-fumantes. No entanto, ao comparar os valores médios do ILM relatados por aqueles autores, verificamos que os dos nossos pacientes eram muito mais elevados, tanto para os ex-fumantes quanto para os que nunca fumaram, demonstrando que os pacientes com ES microaspiram mais, em comparação com indivíduos sem esta doença. Por outro lado, a neutrofilia e a eosinofilia no escarro induzido de nossos pacientes não sofreram influência significativa do tabagismo prévio. Ademais, apenas um dos nossos pacientes ex-fumantes não tinha evidências de aperistalse ou RGE patológico, o que sugere que o ILM elevado esteja relacionado à microaspiração. Assim, nossos pacientes tiveram níveis bastante elevados de ILM, sendo que todos, com exceção de três casos, tinham valores iguais ou superiores a sete. Devido a este fato, nós elegemos arbitrariamente o valor 50 como limite indicativo de microaspiração significativa. Isso foi observado em 20 casos (42.6%), sendo que 10 (21.3%) deles tinham ILM acima de 100. Destes, nove tinham aperistalse e três tinham alterações à TCAR. Dos pacientes com ILM > 50, 80% tinha anormalidades manométricas e mais da metade (55%) tinha alterações tomográficas. Estes achados sugerem que, embora microaspiração provavelmente ocorra em quase todos os pacientes, em graus variáveis, envolvimento pulmonar intersticial relacionado a este fenômeno se desenvolve em cerca de um terço até metade deles, na dependência de outros fatores fisiopatogênicos talvez relacionados ao próprio indivíduo ou ao ambiente. Foi também por nós observado uma correlação positiva entre celularidade total e o ILM e entre contagem de neutrófilos e o ILM. Além disso, o ILM também apresentou correlação inversa com a função pulmonar, medida pela DLco, e a contagem de neutrófilos foi mais elevada em pacientes com alterações tomográficas. Estes dados, associando microaspiração com inflamação das vias aéreas, são originais e sugerem que a microaspiração atua como um agente agressor das vias aéreas, podendo também ser um fator que contribui para a patogênese do envolvimento pulmonar intersticial na ES.

Embora o envolvimento pulmonar característico da ES seja a pneumopatia intersticial, com desenvolvimento de padrão funcional restritivo, alterações obstrutivas e anormalidades das vias aéreas também tem sido relatadas nesses pacientes <sup>(154)</sup>. No passado, estudos documentaram lesões brônquicas em autópsias de pacientes com ES <sup>(152)</sup>, representadas por fibrose peribrônquica e atrofia e fibrose das camadas muscular e elástica dos brônquios, caracterizando alterações obstrutivas, levantando a hipótese de que o processo patológico da doença poderia envolver não só o parênquima mas também as vias

aéreas. Entretanto, as possíveis implicações clínicas destes achados não foram investigadas. Por outro lado, considerando a alta prevalência de alterações obstrutivas observadas por alguns autores nos pacientes com ES, estes sugeriram que as vias aéreas poderiam ser o sítio inicial de lesão pulmonar nesses pacientes <sup>(154)</sup>. Por outro lado, a presença de disfunção das vias aéreas foi encontrada em maior proporção, porém não estatisticamente significativa em relação a controles sadios em pacientes esclerodérmicos não fumantes, sem relação com sintomatologia nem com a presença de lesões intersticiais pulmonares <sup>(224)</sup>. Além disso, outros estudos também questionaram o conceito de as alterações obstrutivas pudessem representar o início do processo de EPI, tendo sido as mesmas atribuídas a tabagismo concomitante nos pacientes esclerodérmicos <sup>(155-156)</sup>. No entanto, um dos principais estudos <sup>(155)</sup> favorecendo a hipótese de que o tabagismo seria responsável pelas anormalidades funcionais obstrutivas nos pacientes esclerodérmicos foi feito na década de 70, quando a interpretação dos testes funcionais ainda não se fazia à luz dos conhecimentos atuais neste tema, prejudicando a avaliação dos resultados. Ao contrário, tais resultados poderiam hoje ser interpretados como indicativos de que a presença de alterações obstrutivas naqueles pacientes na verdade não poderia ser completamente explicada pelo tabagismo concomitante. Em nosso estudo, encontramos padrão funcional obstrutivo em cerca de 20% dos pacientes (proporção similar àquela encontrada para o padrão restritivo), o qual não se associou com tabagismo ou nenhuma outra característica avaliada, tendo sido mais frequentemente observado nos nossos pacientes sem envolvimento pulmonar intersticial. Este achado reforça a hipótese de que as vias aéreas possam ser também acometidas pela doença de modo independente do interstício ou precedendo o envolvimento do mesmo. Assim, o escarro induzido seria uma ferramenta útil na investigação de envolvimento pulmonar na ES. O acometimento das vias aéreas e sua possível relação com o comprometimento intersticial na ES é um interessante campo de pesquisa a ser explorado.

Adicionalmente à inflamação presente nas vias aéreas, cerca de um quarto de nossa casuística apresentou hiperresponsividade brônquica, ao contrário dos controles, dos quais nenhum tinha esta característica. La Corte e cols. <sup>(160)</sup> analisaram 56 pacientes com ES, sendo que 24 deles tinham SS associada, comparando-os com 57 pacientes com SS e com 61 controles. Eles encontraram HB em 25% dos pacientes com ES e em 50% daqueles com SS associada, mais até do que nos pacientes com SS isolada, cuja prevalência de HB foi de

42,5%, contra apenas 6,5% nos controles. Os autores sugeriram que a concomitância das duas doenças aumentaria a chance do aparecimento de HB, pois, além das alterações causadas pela redução da secreção de muco observada na SS, na ES ocorreria também atrofia das glândulas produtoras de muco devido à invasão pela fibrose, reduzindo ainda mais sua secreção, o que poderia desencadear a HB. No entanto, posteriormente nenhum estudo foi realizado no sentido de replicar estes achados e a HB na ES permanece um tema a ser investigado <sup>(160)</sup>. No presente estudo não encontramos nenhuma correlação entre a HB e alterações obstrutivas à espirometria ou padrão inflamatório no escarro induzido, ao contrário do que ocorre caracteristicamente na asma, sugerindo que na ES este fenômeno seja causado por mecanismos fisiopatogênicos distintos e peculiares. Portanto, o significado da HB no contexto da ES pode estar relacionado a uma outra dimensão ainda desconhecida do envolvimento pulmonar. A comprovação da ocorrência frequente de HB na ES pode ter relevância do ponto de vista terapêutico e prognóstico, merecendo portanto ser alvo de futuras pesquisas.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Nos pacientes com esclerose sistêmica estudados, a microaspiração ácido-péptica foi frequente (93,6% dos casos) e apresentou correlação com o comprometimento das vias aéreas, evidenciado pela presença de inflamação neutrofílica no escarro induzido. Associação entre a microaspiração e as alterações tomográficas não foi demonstrada. Por outro lado, os pacientes com envolvimento pulmonar intersticial apresentaram neutrofilia mais acentuada no escarro induzido; a associação entre microaspiração e inflamação das vias aéreas e entre esta e os achados tomográficos sugere que a microaspiração atua como um agente agressor das vias aéreas, podendo também ser um fator que contribui para a patogênese do envolvimento pulmonar intersticial na ES;
2. Envolvimento esofágico foi frequente nos pacientes estudados: 61,7% deles apresentaram alterações manométricas e 70,2% tiveram diagnóstico de RGE patológico; os pacientes com envolvimento esofágico acentuado tiveram maior comprometimento pulmonar intersticial (IT mais elevado) e tenderam a apresentar menores níveis médios de DLCO, mostrando uma associação entre envolvimento esofágico e acometimento pulmonar intersticial nos pacientes estudados, confirmando os achados prévios relatados na literatura;
3. O perfil do escarro induzido dos pacientes revelou um aumento da celularidade total, dos neutrófilos e dos eosinófilos em comparação aos controles, evidenciando presença de inflamação das vias aéreas nestes pacientes;
4. Cinquenta e um por cento dos pacientes apresentou anormalidades à TCAR, sendo as mais frequentemente encontradas as opacidades em vidro fosco (95,8% dos pacientes com TCAR alterada) e a reticulação intralobular (50%), sendo o faveolamento encontrado em 33% dos casos; o IT médio (DP) foi de 4,85, variando de 0 a 18. O padrão tomográfico mais frequente foi aquele de PINE, caracterizado pelo predomínio das opacidades em vidro fosco e faveolamento limitado.

5. Vinte e três por cento dos pacientes apresentaram padrão funcional pulmonar restritivo, associado com a presença de envolvimento pulmonar intersticial. Padrão funcional obstrutivo leve foi observado em 21% dos pacientes, o qual não foi explicado pelo passado de tabagismo e não se associou com nenhuma característica clínica ou do escarro induzido, tendo sido mais frequente nos pacientes sem envolvimento pulmonar intersticial. Quase metade (48%) dos pacientes apresentou redução dos níveis de  $DLCO/VA$ ;
6. Hiperresponsividade brônquica foi encontrada em um terço dos pacientes e em nenhum dos controles, não estando associada com nenhuma outra característica, representando também uma evidência de envolvimento das vias aéreas nestes pacientes;

### **PERSPECTIVAS:**

Com base nos resultados encontrados nesta tese, nós propomos que o escarro induzido, com a análise da celularidade e o teste do Índice Lipídico de Macrófagos, seja incluído, juntamente com as provas de função pulmonar e a TCAR, na avaliação do comprometimento pulmonar dos pacientes com Esclerose Sistêmica. Trata-se de um método simples e não invasivo que se mostrou capaz de identificar um subgrupo de pacientes no qual a microaspiração pode ser um fator relevante na patogênese do envolvimento pulmonar, o que implica em abordagem terapêutica diferenciada destes pacientes.

## REFERÊNCIAS

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 1988 Feb;15(2):202-5.
2. Fantonetti G. Case of general induration of the skin. *Dublin J Med Sci.* 1838;13:158-9.
3. Benedek TG, Rodnan GP. The early history and nomenclature of scleroderma and of its differentiation from sclerema neonatorum and scleroedema. *Semin Arthritis Rheum.* 1982 Aug;12(1):52-67.
4. Goetz RH. The pathology of progressive systemic sclerosis (generalised scleroderma) with special reference to changes in the viscera. *Clin Proc J Cape Town Postgrad Med Ass.* 1945;4:5.
5. Velayos EE, Masi AT, Stevens MB, Shulman LE. The 'CREST' syndrome. Comparison with systemic sclerosis (scleroderma). *Arch Intern Med.* 1979 Nov;139(11):1240-4.
6. Arias-Nunez MC, Llorca J, Vazquez-Rodriguez TR, Gomez-Acebo I, Miranda-Fillooy JA, Martin J, et al. Systemic sclerosis in northwestern Spain: a 19-year epidemiologic study. *Medicine (Baltimore).* 2008 Sep;87(5):272-80.
7. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* 2003 Aug;48(8):2246-55.
8. Tamaki T, Mori S, Takehara K. Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo. *Arch Dermatol Res.* 1991;283(6):366-71.
9. Bernatsky S, Joseph L, Pineau CA, Belisle P, Hudson M, Clarke AE. Scleroderma prevalence: demographic variations in a population-based sample. *Arthritis Rheum.* 2009 Mar 15;61(3):400-4.
10. Roberts-Thomson PJ, Jones M, Hakendorf P, Kencana Dharmapatni AA, Walker JG, MacFarlane JG, et al. Scleroderma in South Australia: epidemiological observations of possible pathogenic significance. *Intern Med J.* 2001 May-Jun;31(4):220-9.
11. Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E, et al. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum.* 1996 Aug;39(8):1362-70.
12. Tan FK, Stivers DN, Foster MW, Chakraborty R, Howard RF, Milewicz DM, et al. Association of microsatellite markers near the

fibrillin 1 gene on human chromosome 15q with scleroderma in a Native American population. *Arthritis Rheum.* 1998 Oct;41(10):1729-37.

13. Englert H, Joyner E, Bade R, Thompson M, Morris D, Chambers P, et al. Systemic scleroderma: a spatiotemporal clustering. *Intern Med J.* 2005 Apr;35(4):228-33.

14. Aryal BK, Khuder SA, Schaub EA. Meta-analysis of systemic sclerosis and exposure to solvents. *Am J Ind Med.* 2001 Sep;40(3):271-4.

15. Kettaneh A, Al Moufti O, Tiev KP, Chayet C, Toledano C, Fabre B, et al. Occupational exposure to solvents and gender-related risk of systemic sclerosis: a metaanalysis of case-control studies. *J Rheumatol.* 2007 Jan;34(1):97-103.

16. Bovenzi M, Barbone F, Pisa FE, Betta A, Romeo L, Tonello A, et al. A case-control study of occupational exposures and systemic sclerosis. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004 Jan;77(1):10-6.

17. Garabrant DH, Lacey JV, Jr., Laing TJ, Gillespie BW, Mayes MD, Cooper BC, et al. Scleroderma and solvent exposure among women. *Am J Epidemiol.* 2003 Mar 15;157(6):493-500.

18. Agarwal SK, Tan FK, Arnett FC. Genetics and genomic studies in scleroderma (systemic sclerosis). *Rheum Dis Clin North Am.* 2008 Feb;34(1):17-40; v.

19. Arnett FC, Gourh P, Shete S, Ahn CW, Honey RE, Agarwal SK, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis.* 2010 May;69(5):822-7.

20. Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suarez H, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet.* 2009 Jun 1;18(11):2071-7.

21. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Hachulla E, Diot E, et al. STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug;60(8):2472-9.

22. Gourh P, Agarwal SK, Divecha D, Assassi S, Paz G, Arora-Singh RK, et al. Polymorphisms in TBX21 and STAT4 increase the risk of systemic sclerosis: evidence of possible gene-gene interaction and alterations in Th1/Th2 cytokines. *Arthritis Rheum.* 2009 Dec;60(12):3794-806.

23. Tsuchiya N, Kawasaki A, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kawaguchi Y, et al. Association of STAT4 polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis.* 2009 Aug;68(8):1375-6.
24. Rueda B, Gourh P, Broen J, Agarwal SK, Simeon C, Ortego-Centeno N, et al. BANK1 functional variants are associated with susceptibility to diffuse systemic sclerosis in Caucasians. *Ann Rheum Dis.* 2010 Apr;69(4):700-5.
25. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Fajardy I, Diot E, et al. Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2009 Jan;60(1):225-33.
26. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Hikami K, et al. Association of a functional polymorphism in the IRF5 region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* 2009 Jun;60(6):1845-50.
27. Agarwal SK, Gourh P, Shete S, Paz G, Divecha D, Reveille JD, et al. Association of interleukin 23 receptor polymorphisms with anti-topoisomerase-I positivity and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2009 Dec;36(12):2715-23.
28. Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, Sestini P, Renzoni EA, Holmes AM, et al. A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2007 Sep 20;357(12):1210-20.
29. Kawaguchi Y, Ota Y, Kawamoto M, Ito I, Tsuchiya N, Sugiura T, et al. Association study of a polymorphism of the CTGF gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis.* 2009 Dec;68(12):1921-4.
30. Dieude P, Wipff J, Guedj M, Ruiz B, Melchers I, Hachulla E, et al. BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4. *Arthritis Rheum.* 2009 Nov;60(11):3447-54.
31. Gourh P, Tan FK, Assassi S, Ahn CW, McNearney TA, Fischbach M, et al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with anti-topoisomerase I- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2006 Dec;54(12):3945-53.
32. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Hachulla E, Diot E, et al. The PTPN22 620W allele confers susceptibility to systemic sclerosis: findings of a large case-control study of European Caucasians and a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2008 Jul;58(7):2183-8.

33. Onengut-Gumuscu S, Ewens KG, Spielman RS, Concannon P. A functional polymorphism (1858C/T) in the PTPN22 gene is linked and associated with type I diabetes in multiplex families. *Genes Immun.* 2004 Dec;5(8):678-80.
34. Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Torres B, Caliz R, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005 Jan;52(1):219-24.
35. Kozyrev SV, Abelson AK, Wojcik J, Zaghlool A, Linga Reddy MV, Sanchez E, et al. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):211-6.
36. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007 Sep 6;357(10):977-86.
37. Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 17;104(16):6758-63.
38. Orozco G, Abelson AK, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Garcia A, et al. Study of functional variants of the BANK1 gene in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Feb;60(2):372-9.
39. Bossini-Castillo L, Simeon CP, Beretta L, Vonk MC, Callejas-Rubio JL, Espinosa G, et al. Confirmation of association of the macrophage migration inhibitory factor gene with systemic sclerosis in a large European population. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Nov;50(11):1976-81.
40. Becker H, Willeke P, Schotte H, Domschke W, Gaubitz M. Macrophage migration inhibitory factor may contribute to vasculopathy in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2008 Oct;27(10):1307-11.
41. Selvi E, Tripodi SA, Catenaccio M, Lorenzini S, Chindamo D, Manganelli S, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2003 May;62(5):460-4.
42. Tan FK. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheum Dis Clin North Am.* 2003 May;29(2):211-37.
43. Kahan A, Menkes CJ, Amor B. Defective Epstein-Barr virus specific suppressor T cell function in progressive systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1986 Jul;45(7):553-60.

44. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N, et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med.* 2006 Jan;3(1):e2.
45. Ohtsuka T, Yamazaki S. Increased prevalence of human parvovirus B19 DNA in systemic sclerosis skin. *Br J Dermatol.* 2004 Jun;150(6):1091-5.
46. Zakrzewska K, Corcioli F, Carlsen KM, Giuggioli D, Fanci R, Rinieri A, et al. Human parvovirus B19 (B19V) infection in systemic sclerosis patients. *Intervirology.* 2009;52(5):279-82.
47. Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 Mar;2(3):134-44.
48. Kahaleh MB. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2004 Nov;16(6):718-22.
49. Scheja A, Akesson A, Geborek P, Wildt M, Wollheim CB, Wollheim FA, et al. Von Willebrand factor propeptide as a marker of disease activity in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Res.* 2001;3(3):178-82.
50. Cerinic MM, Valentini G, Sorano GG, D'Angelo S, Cuomo G, Fenu L, et al. Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2003 Apr;32(5):285-95.
51. McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2003;21(3 Suppl 29):S32-8.
52. Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, Southcott AM, Black CM, du Bois RM, et al. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994 Oct;11(4):439-45.
53. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):557-67.
54. Geyer M, Muller-Ladner U. The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011 Apr;40(2):92-103.
55. Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: Emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmunity Reviews.* [doi: DOI: 10.1016/j.autrev.2010.09.015]. 2011;10(5):267-75.

56. Muller-Ladner U, Distler O, Ibba-Manneschi L, Neumann E, Gay S. Mechanisms of vascular damage in systemic sclerosis. *Autoimmunity*. 2009 Nov;42(7):587-95.
57. Koch AE, Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 2:S3.
58. van Hal TW, van Bon L, Radstake TR. A system out of breath: how hypoxia possibly contributes to the pathogenesis of systemic sclerosis. *Int J Rheumatol*. 2011;2011:824972.
59. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12319-24.
60. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum*. 2004 Jun;50(6):1918-27.
61. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3649-59.
62. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):583-94.
63. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet M-E. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. [doi: DOI: 10.1016/j.autrev.2010.09.016]. 2011;10(5):276-81.
64. Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep*. 2007 May;9(2):136-43.
65. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005 Jan-Feb;13(1):7-12.
66. Cipriani P, Franca Milia A, Liakouli V, Pacini A, Manetti M, Marrelli A, et al. Differential expression of stromal cell-derived factor 1 and its receptor CXCR4 in the skin and endothelial cells of systemic sclerosis patients: Pathogenetic implications. *Arthritis Rheum*. 2006 Sep;54(9):3022-33.
67. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(3):438-46.

68. Salmon-Ehr V, Serpier H, Nawrocki B, Gillery P, Clavel C, Kalis B, et al. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Arch Dermatol*. 1996 Jul;132(7):802-6.
69. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1997 Feb;24(2):328-32.
70. Tsuji-Yamada J, Nakazawa M, Minami M, Sasaki T. Increased frequency of interleukin 4 producing CD4+ and CD8+ cells in peripheral blood from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001 Jun;28(6):1252-8.
71. Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Interleukin-13 stimulates the transcription of the human alpha2(I) collagen gene in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004 Oct 1;279(40):41783-91.
72. Distler JH, Jungel A, Caretto D, Schulze-Horsel U, Kowal-Bielecka O, Gay RE, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):214-25.
73. Kodera M, Hasegawa M, Komura K, Yanaba K, Takehara K, Sato S. Serum pulmonary and activation-regulated chemokine/CCL18 levels in patients with systemic sclerosis: a sensitive indicator of active pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2005 Sep;52(9):2889-96.
74. Pannu J, Trojanowska M. Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 Nov;16(6):739-45.
75. Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2002 Jul;46(7):1703-13.
76. Bhattacharyya S, Ishida W, Wu M, Wilkes M, Mori Y, Hinchcliff M, et al. A non-Smad mechanism of fibroblast activation by transforming growth factor-beta via c-Abl and Egr-1: selective modulation by imatinib mesylate. *Oncogene*. 2009 Mar 12;28(10):1285-97.
77. Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH, et al. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1308-16.
78. Gordon JK, Spiera RF. Targeting tyrosine kinases: a novel therapeutic strategy for systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 Nov;22(6):690-5.

79. Wu M, Melichian DS, de la Garza M, Gruner K, Bhattacharyya S, Barr L, et al. Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *Am J Pathol.* 2009 Sep;175(3):1041-55.
80. Ludwicka A, Ohba T, Trojanowska M, Yamakage A, Strange C, Smith EA, et al. Elevated levels of platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma. *J Rheumatol.* 1995 Oct;22(10):1876-83.
81. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1980 May;23(5):581-90.
82. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001 Jul;28(7):1573-6.
83. Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA, Jr. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum.* 2000 Feb;43(2):444-51.
84. Avouac J, Fransen J, Walker UA, Ricciari V, Smith V, Muller C, et al. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Ann Rheum Dis.* 2011 Mar;70(3):476-81.
85. Goldin JG, Lynch DA, Strollo DC, Suh RD, Schraufnagel DE, Clements PJ, et al. High-resolution CT scan findings in patients with symptomatic scleroderma-related interstitial lung disease. *Chest.* 2008 Aug;134(2):358-67.
86. Johnson SR, Fransen J, Khanna D, Baron M, van den Hoogen F, Medsger TA, Jr., et al. Validation of potential classification criteria for systemic sclerosis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011 Nov 2.
87. Steen VD. The many faces of scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008 Feb;34(1):1-15; v.
88. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum.* 1980 Jun;23(6):617-25.
89. Steen VD, Powell DL, Medsger TA, Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1988 Feb;31(2):196-203.

90. Young MA, Rose S, Reynolds JC. Gastrointestinal manifestations of scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am*. 1996 Nov;22(4):797-823.
91. Desai CS, Lee DC, Shah SJ. Systemic sclerosis and the heart: current diagnosis and management. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Nov;23(6):545-54.
92. Allanore Y, Meune C, Kahan A. Outcome measures for heart involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Oct;47 Suppl 5:v51-3.
93. Okano Y, Medsger TA, Jr. Autoantibody to Th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1990 Dec;33(12):1822-8.
94. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA, Jr. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum*. 2003 Jan;48(1):203-9.
95. Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, Medsger TA, Jr. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum*. 1992 Oct;35(10):1211-7.
96. Aringer M, Steiner G, Smolen JS. Does mixed connective tissue disease exist? Yes. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005 Aug;31(3):411-20, v.
97. Okano Y, Steen VD, Medsger TA, Jr. Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med*. 1993 Nov 15;119(10):1005-13.
98. Santiago M, Baron M, Hudson M, Burlingame RW, Fritzler MJ. Antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis detected by ELISA. *J Rheumatol*. 2007 Jul;34(7):1528-34.
99. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis CV, Medsger TA, Jr. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2009 Apr;60(4):1112-8.
100. Okano Y, Steen VD, Medsger TA, Jr. Autoantibody to U3 nucleolar ribonucleoprotein (fibrillarin) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1992 Jan;35(1):95-100.
101. Marie I. [Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis]. *Presse Med*. 2006 Dec;35(12 Pt 2):1952-65.
102. Kaye SA, Seifalian AM, Lim SG, Hamilton G, Black CM. Ischaemia of the small intestine in patients with systemic sclerosis: Raynaud's phenomenon or chronic vasculopathy? *QJM*. 1994 Aug;87(8):495-500.

103. Ebert EC. Esophageal disease in scleroderma. *J Clin Gastroenterol.* 2006 Oct;40(9):769-75.
104. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med.* 1969 Mar;46(3):428-40.
105. Hamel-Roy J, Devroede G, Arhan P, Tetreault L, Duranceau A, Menard HA. Comparative esophageal and anorectal motility in scleroderma. *Gastroenterology.* 1985 Jan;88(1 Pt 1):1-7.
106. Sjogren RW. Gastrointestinal motility disorders in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1994 Sep;37(9):1265-82.
107. Yarze JC, Varga J, Stampfl D, Castell DO, Jimenez SA. Esophageal function in systemic sclerosis: a prospective evaluation of motility and acid reflux in 36 patients. *Am J Gastroenterol.* 1993 Jun;88(6):870-6.
108. Kaye SA, Siraj QH, Agnew J, Hilson A, Black CM. Detection of early asymptomatic esophageal dysfunction in systemic sclerosis using a new scintigraphic grading method. *J Rheumatol.* 1996 Feb;23(2):297-301.
109. Lahcene M, Oumnia N, Matougui N, Boudjella M, Tebaibia A, Touchene B. Esophageal dysmotility in scleroderma: a prospective study of 183 cases. *Gastroenterol Clin Biol.* 2009 Jun-Jul;33(6-7):466-9.
110. Zamost BJ, Hirschberg J, Ippoliti AF, Furst DE, Clements PJ, Weinstein WM. Esophagitis in scleroderma. Prevalence and risk factors. *Gastroenterology.* 1987 Feb;92(2):421-8.
111. Katzka DA, Reynolds JC, Saul SH, Plotkin A, Lang CA, Ouyang A, et al. Barrett's metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus in scleroderma. *Am J Med.* 1987 Jan;82(1):46-52.
112. Wipff J, Coriat R, Masciocchi M, Caramaschi P, Derk CT, Hachulla E, et al. Outcomes of Barrett's oesophagus related to systemic sclerosis: a 3-year EULAR Scleroderma Trials and Research prospective follow-up study. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Aug;50(8):1440-4.
113. Luedtke P, Levine MS, Rubesin SE, Weinstein DS, Laufer I. Radiologic diagnosis of benign esophageal strictures: a pattern approach. *Radiographics.* 2003 Jul-Aug;23(4):897-909.
114. Ntoumazios SK, Voulgari PV, Potsis K, Koutis E, Tsifetaki N, Assimakopoulos DA. Esophageal involvement in scleroderma: gastroesophageal reflux, the common problem. *Semin Arthritis Rheum.* 2006 Dec;36(3):173-81.
115. Shay SS, Abreu SH, Tsuchida A. Scintigraphy in gastroesophageal reflux disease: a comparison to endoscopy, LESp, and

- 24-h pH score, as well as to simultaneous pH monitoring. *Am J Gastroenterol.* 1992 Sep;87(9):1094-101.
116. Gawron AJ, Hirano I. Advances in diagnostic testing for gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol.* 2010 Aug 14;16(30):3750-6.
117. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jul;66(7):940-4.
118. Bussone G, Mouthon L. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2011 Mar;10(5):248-55.
119. Hassoun PM. Lung involvement in systemic sclerosis. *Presse Med.* 2011 Jan;40(1 Pt 2):e3-e17.
120. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jun 15;165(12):1581-6.
121. Wells AU, Cullinan P, Hansell DM, Rubens MB, Black CM, Newman-Taylor AJ, et al. Fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis has a better prognosis than lone cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Jun;149(6):1583-90.
122. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, et al. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1999 Jun;42(6):1168-78.
123. Divekar AA, Khanna D, Abtin F, Maranian P, Saggarr R, Furst DE, et al. Treatment with imatinib results in reduced IL-4-producing T cells, but increased CD4(+) T cells in the broncho-alveolar lavage of patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol.* 2011 Dec;141(3):293-303.
124. Terrier B, Tamby MC, Camoin L, Guilpain P, Berezne A, Tamas N, et al. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients bind to {alpha}-enolase and are associated with interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis.* 2010 Feb;69(2):428-33.
125. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med.* 2006 Jun 22;354(25):2655-66.
126. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Roth MD, Furst DE, Silver RM, et al. Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Nov 15;176(10):1026-34.

127. Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Selva-O'Callaghan A, Solans-Laque R, Vilardell-Tarres M. Effect of mycophenolate sodium in scleroderma-related interstitial lung disease. *Clin Rheumatol*. 2011 Nov;30(11):1393-8.
128. Behr J, Furst DE. Pulmonary function tests. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Oct;47 Suppl 5:v65-7.
129. Schurawitzki H, Stiglbauer R, Graninger W, Herold C, Polzleitner D, Burghuber OC, et al. Interstitial lung disease in progressive systemic sclerosis: high-resolution CT versus radiography. *Radiology*. 1990 Sep;176(3):755-9.
130. Launay D, Remy-Jardin M, Michon-Pasturel U, Mastora I, Hachulla E, Lambert M, et al. High resolution computed tomography in fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2006 Sep;33(9):1789-801.
131. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA, Jr. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1994 Sep;37(9):1283-9.
132. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Muller NL, Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology*. 2008 Mar;246(3):697-722.
133. Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Nikolakopoulou A, Goh NS, Nicholson AG, et al. CT features of lung disease in patients with systemic sclerosis: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia. *Radiology*. 2004 Aug;232(2):560-7.
134. Ostojic P, Cerinic MM, Silver R, Highland K, Damjanov N. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Lung*. 2007 Jul-Aug;185(4):211-20.
135. Kazerooni EA. High-resolution CT of the lungs. *AJR Am J Roentgenol*. 2001 Sep;177(3):501-19.
136. Warrick JH, Bhalla M, Schabel SI, Silver RM. High resolution computed tomography in early scleroderma lung disease. *J Rheumatol*. 1991 Oct;18(10):1520-8.
137. Volpinari S, La Corte R, Bigli S, Ravenna F, Prandini N, Lo Monaco A, et al. Bronchoalveolar lavage in systemic sclerosis with lung involvement: role and correlations with functional, radiological and scintigraphic parameters. *Rheumatol Int*. 2011 Sep;31(9):1183-8.
138. De Santis M, Bosello SL, Peluso G, Pinnelli M, Alivernini S, Zizzo G, et al. Bronchoalveolar lavage fluid and progression of scleroderma interstitial lung disease. *Clin Respir J*. 2012 Jan;6(1):9-17.

139. Brown H. Treatment of chronic asthma with prednisolone: significance of eosinophils in sputum. *Lancet*. 1958;ii:2.
140. Chodosh S, Zaccheo CW, Segal MS. The cytology and histochemistry of sputum cells. I. Preliminary differential counts in chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis*. 1962 May;85:635-48.
141. O'Connell JM, Baird LI, Campbell AH. Sputum eosinophilia in chronic bronchitis and asthma. *Respiration*. 1978;35(2):65-72.
142. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992 Jan;47(1):25-9.
143. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Aug;154(2 Pt 1):308-17.
144. Lerman Y, Schwarz Y, Kaufman G, Ganor E, Fireman E. Case series: use of induced sputum in the evaluation of occupational lung diseases. *Arch Environ Health*. 2003 May;58(5):284-9.
145. D'Ippolito R, Foresi A, Chetta A, Casalini A, Castagnaro A, Leone C, et al. Induced sputum in patients with newly diagnosed sarcoidosis: comparison with bronchial wash and BAL. *Chest*. 1999 Jun;115(6):1611-5.
146. Antoniou KM, Alexandrakis M, Tzanakis N, Tsiligianni I, Tzortzaki EG, Siafakas NM, et al. Induced sputum versus bronchoalveolar lavage fluid in the evaluation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*. 2005 Jan-Feb;72(1):32-8.
147. Economidou F, Samara KD, Antoniou KM, Siafakas NM. Induced sputum in interstitial lung diseases: novel insights in the diagnosis, evaluation and research. *Respiration*. 2009;77(3):351-8.
148. Vatrella A, Bocchino M, Perna F, Scarpa R, Galati D, Spina S, et al. Induced sputum as a tool for early detection of airway inflammation in connective diseases-related lung involvement. *Respir Med*. 2007 Jul;101(7):1383-9.
149. Yilmaz N, Abul Y, Bicakcigil M, Golabi P, Celikel C, Karakurt S, et al. Induced sputum as a method for detection of systemic sclerosis-related interstitial lung disease. *Rheumatol Int*. 2011 Mar 30.
150. Damjanov N, Ostojic P, Kaloudi O, Alari S, Guiducci S, Stanflin N, et al. Induced sputum in systemic sclerosis interstitial lung disease: comparison to healthy controls and bronchoalveolar lavage. *Respiration*. 2009;78(1):56-62.

151. Sanchez-Vidaurre S, Simeon CP, Cruz MJ, Fonollosa V, Vilardell M, Morell F, et al. Latent pulmonary inflammation in patients with systemic sclerosis. *Arch Bronconeumol*. 2012 Jan;48(1):8-13.
152. Spain DM, Thomas AG. The pulmonary manifestations of scleroderma; an anatomic-physiological correlation. *Ann Intern Med*. 1950 Jan;32(1):152-61, illust.
153. Ashba JK, Ghanem MH. The Lungs in Systemic Sclerosis. *Dis Chest*. 1965 Jan;47:52-64.
154. Guttadauria M, Ellman H, Emmanuel G, Kaplan D, Diamond H. Pulmonary function in scleroderma. *Arthritis Rheum*. 1977 Jun;20(5):1071-9.
155. Bjerke RD, Tashkin DP, Clements PJ, Chopra SK, Gong H, Jr., Bein M. Small airways in progressive systemic sclerosis (PSS). *Am J Med*. 1979 Feb;66(2):201-9.
156. Steen VD, Owens GR, Fino GJ, Rodnan GP, Medsger TA, Jr. Pulmonary involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1985 Jul;28(7):759-67.
157. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl*. 1993 Mar;16:53-83.
158. Potena A, La Corte R, Fabbri LM, Papi A, Trotta F, Ciaccia A. Increased bronchial responsiveness in primary and secondary Sjogren's syndrome. *Eur Respir J*. 1990 May;3(5):548-53.
159. La Corte R, Potena A, Bajocchi G, Fabbri L, Trotta F. Increased bronchial responsiveness in primary Sjogren's syndrome. A sign of tracheobronchial involvement. *Clin Exp Rheumatol*. 1991 Mar-Apr;9(2):125-30.
160. La Corte R, Bajocchi G, Potena A, Govoni M, Trotta F. Bronchial hyperreactivity in systemic sclerosis patients: influence of associated Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1995 Aug;54(8):636-9.
161. Schachter LM, Dixon J, Pierce RJ, O'Brien P. Severe gastroesophageal reflux is associated with reduced carbon monoxide diffusing capacity. *Chest*. 2003 Jun;123(6):1932-8.
162. Mays EE, Dubois JJ, Hamilton GB. Pulmonary fibrosis associated with tracheobronchial aspiration. A study of the frequency of hiatal hernia and gastroesophageal reflux in interstitial pulmonary fibrosis of obscure etiology. *Chest*. 1976 Apr;69(4):512-5.

163. du Bois RM. Idiopathic pulmonary fibrosis: now less idiopathic? *Respir Med.* 2009 Jun;103(6):791-2.
164. Raghu G, Yang ST, Spada C, Hayes J, Pellegrini CA. Sole treatment of acid gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis: a case series. *Chest.* 2006 Mar;129(3):794-800.
165. Patti MG, Tedesco P, Golden J, Hays S, Hoopes C, Meneghetti A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: how often is it really idiopathic? *J Gastrointest Surg.* 2005 Nov;9(8):1053-6; discussion 6-8.
166. Ing AJ. Interstitial lung disease and gastroesophageal reflux. *Am J Med.* 2001 Dec 3;111 Suppl 8A:41S-4S.
167. Tobin RW, Pope CE, 2nd, Pellegrini CA, Emond MJ, Sillery J, Raghu G. Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Dec;158(6):1804-8.
168. Raghu G, Freudenberger TD, Yang S, Curtis JR, Spada C, Hayes J, et al. High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2006 Jan;27(1):136-42.
169. Gribbin J, Hubbard R, Smith C. Role of diabetes mellitus and gastro-oesophageal reflux in the aetiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2009 Jun;103(6):927-31.
170. Lee JS, Collard HR, Raghu G, Sweet MP, Hays SR, Campos GM, et al. Does chronic microaspiration cause idiopathic pulmonary fibrosis? *Am J Med.* 2010 Apr;123(4):304-11.
171. Appel JZ, 3rd, Lee SM, Hartwig MG, Li B, Hsieh CC, Cantu E, 3rd, et al. Characterization of the innate immune response to chronic aspiration in a novel rodent model. *Respir Res.* 2007;8:87.
172. D'Ovidio F, Mura M, Tsang M, Waddell TK, Hutcheon MA, Singer LG, et al. Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 May;129(5):1144-52.
173. Davis RD, Jr., Lau CL, Eubanks S, Messier RH, Hadjiliadis D, Steele MP, et al. Improved lung allograft function after fundoplication in patients with gastroesophageal reflux disease undergoing lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Mar;125(3):533-42.
174. Cantu E, 3rd, Appel JZ, 3rd, Hartwig MG, Woreta H, Green C, Messier R, et al. J. Maxwell Chamberlain Memorial Paper. Early fundoplication prevents chronic allograft dysfunction in patients with gastroesophageal reflux disease. *Ann Thorac Surg.* 2004 Oct;78(4):1142-51; discussion -51.

175. Mahrer PR, Evans JA, Steinberg I. Scleroderma: relation of pulmonary changes to esophageal disease. *Ann Intern Med.* 1954 Jan;40(1):92-110.
176. Johnson DA, Drane WE, Curran J, Cattau EL, Jr., Ciarleglio C, Khan A, et al. Pulmonary disease in progressive systemic sclerosis. A complication of gastroesophageal reflux and occult aspiration? *Arch Intern Med.* 1989 Mar;149(3):589-93.
177. Troshinsky MB, Kane GC, Varga J, Cater JR, Fish JE, Jimenez SA, et al. Pulmonary function and gastroesophageal reflux in systemic sclerosis. *Ann Intern Med.* 1994 Jul 1;121(1):6-10.
178. Marie I, Dominique S, Levesque H, Ducrotte P, Denis P, Hellot MF, et al. Esophageal involvement and pulmonary manifestations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2001 Aug;45(4):346-54.
179. Marie I, Ducrotte P, Denis P, Hellot MF, Levesque H. Oesophageal mucosal involvement in patients with systemic sclerosis receiving proton pump inhibitor therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Dec;24(11-12):1593-601.
180. Savarino E, Bazzica M, Zentilin P, Pohl D, Parodi A, Cittadini G, et al. Gastroesophageal reflux and pulmonary fibrosis in scleroderma: a study using pH-impedance monitoring. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Mar 1;179(5):408-13.
181. Carlo-Stella N, Belloli L, Barbera R, Gambaro C, Rando G, Malesci A, et al. Gastroesophageal reflux and lung disease in systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Jun 15;179(12):1167; author reply -8.
182. de Souza RB, Borges CT, Capelozzi VL, Parra ER, Jatene FB, Kavakama J, et al. Centrilobular fibrosis: an underrecognized pattern in systemic sclerosis. *Respiration.* 2009;77(4):389-97.
183. Gilson M, Zerkak D, Wipff J, Dusser D, Dinh-Xuan AT, Abitbol V, et al. Prognostic factors for lung function in systemic sclerosis: prospective study of 105 cases. *Eur Respir J.* 2010 Jan;35(1):112-7.
184. Hershcovici T, Jha LK, Johnson T, Gerson L, Stave C, Malo J, et al. Systematic review: the relationship between interstitial lung diseases and gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Dec;34(11-12):1295-305.
185. Elidemir O, Fan LL, Colasurdo GN. A novel diagnostic method for pulmonary aspiration in a murine model. Immunocytochemical staining of milk proteins in alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Feb;161(2 Pt 1):622-6.

186. Pinto LA, Dias AC, Machado DC, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM. Diagnosis of pulmonary aspiration: a mouse model using a starch granule test in bronchoalveolar lavage. *Respirology*. 2008 Jun;13(4):594-8.
187. Yang YJ, Steele CT, Anbar RD, Sinacori JT, Powers CN. Quantitation of lipid-laden macrophages in evaluation of lower airway cytology specimens from pediatric patients. *Diagn Cytopathol*. 2001 Feb;24(2):98-103.
188. Hadda V, Khilnani GC. Lipoid pneumonia: an overview. *Expert Rev Respir Med*. 2010 Dec;4(6):799-807.
189. Vejar L, Le Cerf P. [Pulmonary aspiration in children. Quantification of lipid laden alveolar macrophages]. *Rev Med Chil*. 1997 Feb;125(2):191-4.
190. Corwin W, Irwin R. The Lipid Laden Alveolar Macrophage as a Marker of aspiration in Parenchymal Lung Disease. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:576-81.
191. Ahrens P, Noll C, Kitz R, Willigens P, Zielen S, Hofmann D. Lipid-laden alveolar macrophages (LLAM): a useful marker of silent aspiration in children. *Pediatr Pulmonol*. 1999 Aug;28(2):83-8.
192. Borrelli O, Battaglia M, Galos F, Aloï M, De Angelis D, Moretti C, et al. Non-acid gastro-oesophageal reflux in children with suspected pulmonary aspiration. *Dig Liver Dis*. 2010 Feb;42(2):115-21.
193. Rosen R, Fritz J, Nurko A, Simon D, Nurko S. Lipid-laden macrophage index is not an indicator of gastroesophageal reflux-related respiratory disease in children. *Pediatrics*. 2008 Apr;121(4):e879-84.
194. Colombo JL, Hallberg TK. Pulmonary aspiration and lipid-laden macrophages: in search of gold (standards). *Pediatr Pulmonol*. 1999 Aug;28(2):79-82.
195. Sacco O, Fregonese B, Silvestri M, Sabatini F, Mattioli G, Rossi GA. Bronchoalveolar lavage and esophageal pH monitoring data in children with "difficult to treat" respiratory symptoms. *Pediatr Pulmonol*. 2000 Oct;30(4):313-9.
196. Parameswaran K, Anvari M, Efthimiadis A, Kamada D, Hargreave FE, Allen CJ. Lipid-laden macrophages in induced sputum are a marker of oropharyngeal reflux and possible gastric aspiration. *Eur Respir J*. 2000 Dec;16(6):1119-22.
197. Koksall D, Ozkan B, Simsek C, Koksall AS, Agackyan Y, Sasmaz N. Lipid-laden alveolar macrophage index in sputum is not useful in the differential diagnosis of pulmonary symptoms secondary to gastroesophageal reflux. *Arch Med Res*. 2005 Sep-Oct;36(5):485-9.

198. Hopkins PM, Kermeen F, Duhig E, Fletcher L, Gradwell J, Whitfield L, et al. Oil red O stain of alveolar macrophages is an effective screening test for gastroesophageal reflux disease in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2010 Aug;29(8):859-64.
199. Bauer ML, Lyrene RK. Chronic aspiration in children: evaluation of the lipid-laden macrophage index. *Pediatr Pulmonol*. 1999 Aug;28(2):94-100.
200. Lock G, Pfeifer M, Straub RH, Zeuner M, Lang B, Scholmerich J, et al. Association of esophageal dysfunction and pulmonary function impairment in systemic sclerosis. *Am J Gastroenterol*. 1998 Mar;93(3):341-5.
201. Denis P, Ducrotte P, Pasquis P, Lefrancois R. Esophageal motility and pulmonary function in progressive systemic sclerosis. *Respiration*. 1981;42(1):21-4.
202. Christmann RB, Wells AU, Capelozzi VL, Silver RM. Gastroesophageal reflux incites interstitial lung disease in systemic sclerosis: clinical, radiologic, histopathologic, and treatment evidence. *Semin Arthritis Rheum*. 2010 Dec;40(3):241-9.
203. Carpagnano GE, Resta O, Ventura MT, Amoroso AC, Di Gioia G, Giliberti T, et al. Airway inflammation in subjects with gastro-oesophageal reflux and gastro-oesophageal reflux-related asthma. *J Intern Med*. 2006 Mar;259(3):323-31.
204. Kwiecien J, Machura E, Halkiewicz F, Karpe J. Clinical features of asthma in children differ with regard to the intensity of distal gastroesophageal acid reflux. *J Asthma*. 2011 May;48(4):366-73.
205. Veras TN, Pizzichini E, Steidle LJ, Rocha CC, Moritz P, Pizzichini MM. Cellular composition of induced sputum in healthy adults. *J Bras Pneumol*. 2011 Jun;37(3):348-53.
206. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1995 Jul;22(7):1281-5.
207. Johnson LF, DeMeester TR. Development of the 24-hour intraesophageal pH monitoring composite scoring system. *J Clin Gastroenterol*. 1986;8 Suppl 1:52-8.
208. Juniper EF, editor. Histamine and Methacholine Inhalation Tests: a Laboratory Tidal breathing Protocol. Lund ,Sweden: Thoracic Societé Canadienne de Thoracologie; 1991.
209. Crapo RO, Morris AH, Gardner RM. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. *Am Rev Respir Dis*. 1981 Jun;123(6):659-64.

210. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005 Nov;26(5):948-68.
211. Denton CP, Krieg T, Guillevin L, Schwierin B, Rosenberg D, Silkey M, et al. Demographic, clinical and antibody characteristics of patients with digital ulcers in systemic sclerosis: data from the DUO Registry. *Ann Rheum Dis*. 2012 May;71(5):718-21.
212. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis*. 2007 Jun;66(6):754-63.
213. Perez-Bocanegra C, Solans-Laque R, Simeon-Aznar CP, Campillo M, Fonollosa-Pla V, Vilardell-Tarres M. Age-related survival and clinical features in systemic sclerosis patients older or younger than 65 at diagnosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Jun;49(6):1112-7.
214. Jezler SS, MB; Andrade, TA; Araujo Neto, C; Braga, H; Cruz, AA. Interstitial lung disease in patients with progressive systemic sclerosis. A study of 58 cases. *J Bras Pneumol*. 2005;31(4):6.
215. Clements PJ, Allanore Y, Khanna D, Singh M, Furst DE. Arthritis in systemic sclerosis: systematic review of the literature and suggestions for the performance of future clinical trials in systemic sclerosis arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Jun;41(6):801-14.
216. Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Ramos-Casals M, Campillo-Grau M, et al. Registry of the spanish network for systemic sclerosis: clinical pattern according to cutaneous subsets and immunological status. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Jun;41(6):789-800.
217. Sheehan NJ. Dysphagia and other manifestations of oesophageal involvement in the musculoskeletal diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Jun;47(6):746-52.
218. Wells AU, Hansell DM, Corrin B, Harrison NK, Goldstraw P, Black CM, et al. High resolution computed tomography as a predictor of lung histology in systemic sclerosis. *Thorax*. 1992 Sep;47(9):738-42.
219. Bellia M, Cannizzaro F, Scichilone N, Riili M, Triolo G, Midiri M, et al. HRCT and scleroderma: semiquantitative evaluation of lung damage and functional abnormalities. *Radiol Med*. 2009 Mar;114(2):190-203.
220. McNearney TA, Reveille JD, Fischbach M, Friedman AW, Lisse JR, Goel N, et al. Pulmonary involvement in systemic sclerosis:

associations with genetic, serologic, sociodemographic, and behavioral factors. *Arthritis Rheum.* 2007 Mar 15;57(2):318-26.

221. Kim EA, Johkoh T, Lee KS, Ichikado K, Koh EM, Kim TS, et al. Interstitial pneumonia in progressive systemic sclerosis: serial high-resolution CT findings with functional correlation. *J Comput Assist Tomogr.* 2001 Sep-Oct;25(5):757-63.

222. Sweet MP, Patti MG, Leard LE, Golden JA, Hays SR, Hoopes C, et al. Gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis referred for lung transplantation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* [doi: DOI: 10.1016/j.jtcvs.2006.09.085]. 2007;133(4):1078-84.

223. Wilson AM, Nair P, Hargreave FE, Efthimiadis AE, Anvari M, Allen CJ. Lipid and smoker's inclusions in sputum macrophages in patients with airway diseases. *Respir Med.* 2011 Nov;105(11):1691-5.

224. Kostopoulos C, Rassidakis A, Sfikakis PP, Antoniadou L, Mavrikakis M. Small airways dysfunction in systemic sclerosis. A controlled study. *Chest.* 1992 Sep;102(3):875-81.

## APÊNDICE

Consentimento Livre e Esclarecido



**NUPAIVA**  
Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas  
H.U. - U.F.S.C.



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**ESTUDO: INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS E ENVOLVIMENTO PULMONAR INTERSTICIAL NA ESCLEROSE SISTÊMICA: ASSOCIAÇÃO COM ALTERAÇÕES ESOFÁGICAS E MICROASPIRAÇÃO**

**Pesquisadora: Dra. Adriana Fontes Zimmermann**

**Coordenadora / Orientadora da pesquisa: Profa. Dra. Marcia Pizzichini**

Eu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ confirmo

que

o

Dr.(a)  
discut

\_\_\_\_\_ **iu este estudo comigo. Eu entendi que:**

1. A esclerose sistêmica (ES) , ou esclerodermia, é uma doença crônica que afeta principalmente os pulmões, a pele, o aparelho digestivo e a circulação sanguínea, levando a endurecimento dos órgãos e problemas de funcionamento dos mesmos. Um dos principais e mais graves problemas que pode ocorrer com pacientes com ES é o comprometimento dos pulmões, onde o paciente vai perdendo a capacidade respiratória, tendo cada vez mais dificuldade para respirar e tendo prejudicadas as suas atividades no dia a dia. Outro problema muito comum nos pacientes com ES (pode ocorrer em até 80% dos pacientes) é o refluxo gastro-esofágico (RGE), causado pelo endurecimento e perda dos movimentos normais do esôfago, o tubo que liga a faringe (garganta) com o estômago; o RGE é a volta do conteúdo do estômago para o esôfago, o qual pode voltar até a garganta, havendo a possibilidade de ser

aspirado (sugado) pelo paciente, sem querer e sem perceber, até os pulmões. Se isto acontecer muitas vezes, o material do estômago, que é ácido, pode causar inflamação e piora do endurecimento dos pulmões, piorando a doença. Devido a sua importância, este fato tem sido bastante estudado atualmente e necessita de melhor compreensão.

**2. Este estudo é a tese de pós graduação (doutorado) da Dra Adriana Fontes Zimmermann, reumatologista do HU-UFSC e Hospital Governador Celso Ramos, professora de Reumatologia da Faculdade de Medicina da UFSC, orientada pelo Profa. Dra. Marcia Pizzichini, pneumologista do HU-UFSC, pesquisadora do NUPAIVA (Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas) , na UFSC e professora de Pneumologia da UFSC. O estudo tem como objetivo principal investigar se os pacientes com ES apresentam refluxo gastro-esofágico (RGE) e se estão aspirando pequenas quantidades do conteúdo do estômago para os pulmões (microaspiração); este estudo também quer investigar se os pacientes que tem RGE tem também mais anormalidades nos pulmões, que poderiam ser causadas ou pioradas pela microaspiração.**

Este é um estudo em que serão realizados apenas exames (de laboratório e outros, que serão explicados abaixo), não há nenhuma aplicação ou teste de uso de medicamentos. Você poderá continuar seu tratamento normalmente durante a realização do estudo, apenas terão que ser suspensos os medicamentos omeprazol, pantoprazol ou equivalentes, ranitidina, cimetidina, bromoprida, metoclopramida ou equivalentes e corticóides (como prednisona ou similares) por um período de cinco dias antes dos exames e reiniciados logo após os mesmos.

**3. Você poderá participar do estudo se tiver mais de 18 anos e se tiver esclerose sistêmica há pelo menos 2 (dois) anos, contados a partir da ocasião em que pela primeira vez você percebeu que suas mãos e/ou pés ficavam cianóticos (roxos) e/ou pálidos (brancos) em contato com o frio ou em dias muito frios; o diagnóstico deve ter sido confirmado por um reumatologista, que é o especialista nesta doença.**

4. O estudo será realizado em pelo menos quatro visitas, com duração de cerca de 1 hora e 30 minutos, podendo haver mais visitas, se algum teste precisar ser repetido; será feita uma entrevista com você, contendo perguntas sobre seus dados pessoais (nome, endereço, escolaridade, etc) e sobre dados de saúde geral e relacionados à doença; você será examinado pela médica. Serão feitos os seguintes exames complementares:

5. No laboratório –HU: Serão colhidas aproximadamente 2 colheres de sopa (40 mL) de sangue, através de uma agulha na sua veia, para testes laboratoriais.

6. **Teste de função pulmonar (TFP), ou espirometria, pletismografia e teste de metacolina:** você deverá soprar em um tubo com força, de acordo com as instruções do examinador e receberá inalações (nebulizações) com uma substância que pode provocar certo fechamento dos brônquios (vias que levam o ar até os pulmões) e depois deverá soprar novamente, para ver se houve redução do ar que sai dos pulmões; depois fará mais duas ou três nebulizações com metacolina, outra substância que pode causar fechamento dos brônquios, que é um teste para verificar se v. tem asma (bronquite) não diagnosticada e deverá soprar novamente; a duração do exame é variável, depende de v. realizar corretamente as instruções, mas não costuma durar mais de meia hora;

**Coleta de escarro:** Após receber nebulizações com água e sal, você deverá tossir para produzir escarro (catarro), que será coletado para exames; duração do exame varia com a quantidade e qualidade do escarro obtido;

**Tomografia computadorizada do tórax:** feito em um aparelho especial, não fechado, onde você deverá ficar imóvel, deitado de costas e de braços e respirar fundo prendendo depois a respiração; o exame dura cerca de 20 minutos a meia hora;

**PHmetria ou medida do pH esofágico (acidez do esôfago): e manometria esofágica (medida das pressões do esôfago):** Estes testes são feitos introduzindo-se um cateter (tubo bem fino de plástico) através do nariz indo até o esôfago, com um sensor para a medida das pressões do esôfago. O outro

teste também utiliza um cateter semelhante, porém este é ligado a um pequeno aparelho que ficará fixado em seu braço ou em sua cintura, registrando os movimentos de refluxo (retorno) do conteúdo do estômago para dentro do esôfago durante o dia inteiro (24 horas) e registrando o pH (acidez) do conteúdo dentro do esôfago. No dia seguinte v. deverá voltar ao hospital para a retirar o cateter e entregar o aparelho.

7. Os riscos associados com estes procedimentos são mínimos. Eles incluem um leve aperto no peito, “chio”, ou falta de ar durante os testes respiratórios ou durante a nebulização com a solução de água e sal para produzir catarro. Estes sintomas melhoram espontaneamente ou dentro de minutos após o uso da bombinha com broncodilatador. A retirada de sangue pode causar equimoses (manchas roxas) que desaparecerão espontaneamente. V, poderá sentir um pouco de desconforto na colocação do cateter do esôfago, mas isto é feito por pessoal experiente e de maneira delicada, portanto esta sensação costuma ser breve. Também poderá sentir algum desconforto enquanto estiver com o mesmo, mas geralmente é leve e não costuma atrapalhar as atividades diárias.

8. Eu compreendo que minha participação neste estudo é voluntária e eu estou livre para sair do estudo em qualquer momento sem que isto prejudique meu tratamento médico futuro e atendimentos no HU. Toda a informação obtida neste estudo será confidencial e eu não serei identificado por meu nome em qualquer publicação científica referente a este estudo. A médica do estudo responderá quaisquer perguntas que eu tiver sobre este estudo e sobre os resultados dos testes que serão realizados. Se eu tiver qualquer dúvida ou preocupações eu posso telefonar para a Médica desse estudo, Dra Adriana Fontes Zimmermann nos telefones 48 3222 9357 ou 48 9971 2343.

9. Eu deverei concordar em responder as perguntas e questionários e aceitar fazer da melhor maneira possível os

testes que serão realizados durante o estudo, os quais estão listados. Estou ciente de que este estudo não vai influenciar a evolução da minha doença, mas sei também que ele visa contribuir para esclarecer um aspecto importante da esclerose sistêmica, o que implica em melhorias no tratamento dos pacientes com esta doença. Eu concordo em participar deste estudo.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

*Assinatura*

*do*

*Paciente:* \_\_\_\_\_

**\_Médico:** Declaro que esclareci todos os propósitos do estudo, solucionei todas as dúvidas do paciente e obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

*Assinatura*

*do*

*médico:*

*DATA:*

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

**CERTIFICADO**

**Nº 173**

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**APROVADO**

**PROCESSO: 185/09**

**FR-270108**

**TÍTULO:** Associação entre refluxo gastro-esofágico ácido e comprometimento do aparelho respiratório na esclerose sistêmica: perfil inflamatório e índice lipídico de macrófagos no escarro induzido.

**AUTOR:** Adriana Fontes Zimmermann e Emílio Pizzichini.

**DPTO.:** CCS/UFSC

**FLORIANÓPOLIS, 29 de junho de 2009.**

Coordenador do CEPSH/UFSC - Prof.º Washington Portela de Souza