GABRIELA FRANCO MARQUES

**Avaliação das populações de macrófagos de fenótipo M1/M2 e
marcadores de ativação do inflamassoma em pacientes com
poliarterite nodosa cutânea**

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

Departamento de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marques, Gabriela Franco
Avaliação das populações de macrófagos de fenótipo
M1/M2 e marcadores de ativação do inflamassoma em
pacientes com poliarterite nodosa cutânea / Gabriela
Franco Marques. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Paulo Ricardo Criado.

Descritores: 1.Poliarterite nodosa 2.Arterite
3.Vasculite 4.Macrófagos 5.Ativação de macrófagos
6.Inflamassomos 7.Imunidade inata

USP/FM/DBD-071/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À DEUS, por fazer parte de minha caminhada iluminando-me para o bem, sendo parte de meus princípios morais, éticos e religiosos.

Aos meus pais, MILTON E MYLÈNE, dos quais trago alegria indizível no coração por ter convicção de que deles sou semente, sendo persistentemente cuidada, educada, abnegadamente amada e motivada a conquistar este grande sonho.

À minha avó LAURINDA, por estar presente nos principais momentos da minha vida e sempre incentivar meus estudos.

À querida LINDOMAR, por cuidar tão bem de mim.

À minha amada irmã JULIANA, por ser minha melhor amiga e não medir esforços para me ver feliz.

Ao meu marido EDUARDO, pelo apoio incondicional e incentivo ao longo dessa jornada.

Aos meus grandes amigos de faculdade, LETÍCIA, MARIA PAULA, TALITA, GUILHERME e HUGO, pela convivência e provas de amizade durante todos esses anos de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. PAULO RICARDO CRIADO, Pesquisador Pleno da Pós-graduação da Faculdade de Medicina do ABC e orientador do presente trabalho, por inestimável atenção, dedicação ao ensino, preciosa amizade, incentivo e orientação durante a realização dessa tese.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia da Disciplina de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração durante a realização do estudo imuno-histoquímico.

Aos funcionários do Laboratório de Dermatopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração na seleção das lâminas de anatomopatológico.

Aos funcionários RUTH, MARCELO e RODRIGO, do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por se colocarem sempre à disposição para esclarecer dúvidas sobre o Programa de Pós-graduação.

E a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para que essa pesquisa fosse desenvolvida.

*“Nada existe tão alto que o homem,
com força de vontade, não possa
apoiar a sua escada.”*

Friedrich Schiller

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Primário	23
2.2	Objetivo Secundário	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	Definição, nomenclatura e classificação das vasculites	25
3.2	Poliarterite nodosa cutânea	25
3.3	Macrófagos	43
3.4	Inflamassoma	47
4	MÉTODOS	51
4.1	Considerações éticas	51
4.2	Desenho do estudo	51
4.3	Casuística	51
4.4	Coleta de dados	52
4.5	Procedimentos	53
4.6	Protocolo de realização de técnica de imuno-histoquímica	54
4.7	Análise semiquantitativa dos macrófagos e inflamassoma	55
4.8	Análise estatística	56
5	RESULTADOS	58
5.1	Recrutamento dos pacientes	58
5.2	Distribuição por gênero e idade	58
5.3	Tempo de seguimento	59
5.4	Comorbidades	59
5.5	Manifestações clínicas e distribuição anatômica das lesões	59
5.6	Exames complementares	61
5.7	Imunofluorescência direta	61

5.8	Anatomopatológico e imuno-histoquímica	63
5.9	Análise da população de macrófago M1/M2	70
5.10	Análise dos marcadores do inflamassoma	72
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	85
8	ANEXOS	87
9	REFERÊNCIAS	94

LISTA DE SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ADA2	adenosina desaminase 2
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
ANCA	Anticorpo anticitoplasma de neutrófilos
Apaf-1	Fator ativador da apoptose 1
ASC	“Apoptosis-associated speck-like protein containg a CARD”
ASLO	Anticorpo antiestreptolisina O
BIR	Domínios de repetições de proteínas inibidoras da apoptose de baculovírus
CARD	Domínios de recrutamento e ativação das caspase
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CSF-1	Fator estimulador de colônia 1
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAN	Fator antinuclear
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos
GPA	Granulomatose com poliangiite
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LPS	Lipopolisacarídeos
LRRs	Domínios ricos em leucina

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MPO	Mieloperoxidase
NACHT	Domínio central de oligomerização
NK	natural killer
NLRs	“Nod Like Receptors”
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PAM	Poliangiite microscópica
PAN	Poliarterite nodosa
PANC	Poliarterite nodosa cutânea
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPD	Purified protein derivative
PS	Fosfatidilserina
PT	Protrombina
PYD	Domínios de pirina
SOCS3	Proteína intracelular supressora da sinalização de citocina 3
STAT	Transdutores de sinais e ativadores de transcrição
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VHS	Velocidade de hemossedimentação

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Tipos de vasos definidos como vasos de grande (A), médio (B) e pequeno calibre (C) de acordo com o sistema de nomenclatura instituído na Conferência Internacional de Consenso de Chapel Hill em 2012. O rim é usado para exemplificar vasos médios e pequenos. Os grandes vasos são a aorta, seus principais ramos e veias análogas. Os vasos médios são as principais artérias e veias viscerais e seus ramos iniciais. Pequenos vasos são artérias intraparenquimatosas..... 26
- Figura 2 –** Classificação das vasculites de acordo com o calibre dos vasos predominantemente acometidos..... 26
- Figura 3 –** Mecanismo de morte celular por apoptose com translocação do fosfolípídeo fosfatidilserina (PS) para a superfície da membrana plasmática..... 31
- Figura 4 –** Produção e papel fisiológico da ADA2: É uma isoenzima produzida e secretada por células mieloides, que exerce sua atividade enzimática no espaço extracelular, principalmente na presença de pH baixo ou altas temperaturas. (A) Nos monócitos, a ADA2 atua como fator de crescimento: induz a proliferação de monócitos e promove a diferenciação de macrófagos anti-inflamatórios M2. (B) Nos neutrófilos, a ADA2 induz a expressão de proteínas pró-inflamatórias, como a mieloperoxidase (MPO), e a ativação de neutrófilos, levando à secreção de citocinas pró-inflamatórias. (C) Existem ainda evidências indiretas de uma possível atuação da ADA2 como fator de crescimento para células endoteliais, exercendo um papel fundamental na manutenção da integridade vascular..... 33
- Figura 5 –** Manifestações cutâneas da PANC: (A) Livedo racemosa em membros inferiores e nódulo subcutâneo indicado pela seta; (B) Nódulos subcutâneos indicados por círculos e livedo racemosa exuberante; (C) Úlceras em dorso do pé e terço inferior da perna esquerda..... 35
- Figura 6 –** Exame anatomopatológico (HE): (A) Artéria de médio calibre na junção dermo-hipodérmica (3mm); (B) No detalhe, necrose fibrinóide da parede vascular, espessamento subintimal, permeação da parede por infiltrado inflamatório e lúmen vascular preenchido por trombo de fibrina (300µm)..... 37

Figura 7 –	Ilustração esquemática dos achados histopatológicos nos diferentes estágios evolutivos da PANC.....	39
Figura 8 –	Monócitos são produzidos na medula óssea e transportados para corrente sanguínea e tecidos estimulados por citocinas para dar origem aos macrófagos. Na medula óssea, as células tronco hematopoiéticas originam células progenitoras de macrófagos e células dendríticas, que se dividem em dois subtipos de monócitos, os monócitos Ly6C+CX3CR1loCCR2+CD62L+ e os monócitos Ly6CloCX3CR1hiCCR2-CD62L-. Ambos subtipos são liberados na corrente sanguínea após sinalização das quimiocinas CCR2 e MCP-3. Uma vez dentro dos vasos sanguíneos, monócitos estão aptos a extravasar e chegar aos tecidos pela sinalização das quimiocinas CCR2 e CX3CR1. Os macrófagos serão gerados com suas próprias características e nomes de acordo com o local de migração.....	44
Figura 9 –	Diferenciação dos monócitos de acordo com as citocinas estimulantes. Na presença de IFN- γ e produtos bacterianos os monócitos são diferenciados em macrófagos M1. Na presença de CSF-1, IL-4, IL-10 e IL-13, corticosteróides e vitamina D3 os monócitos são diferenciados em macrófagos M2. Os subtipos M1 e M2 diferem-se com relação ao fenótipo e função. Células M1 tem elevado poder antibacteriano, imunoestimulatório e de promover citotoxicidade tumoral. Células M2 tem elevada capacidade de remover detritos, estimular a angiogênese e promover remodelação e reparo tecidual.....	46
Figura 10 –	Interação entre NLRs, ASC e Caspase 1 levando a formação do complexo proteico denominado inflamassoma.....	48
Figura 11 –	Exame anatomopatológico: (A) Vaso de médio calibre na junção dermo-hipodérmica com infiltrado inflamatório perivascular (HE, 2mm). (B) No detalhe, artéria médio calibre com parede permeada por infiltrado neutrofílico (HE, 200 μ m).....	63
Figura 12 –	Exame anatomopatológico (HE, 400 μ m): Artéria de médio calibre localizada no subcutâneo com infiltrado inflamatório perivascular exuberante e oclusão intraluminal com depósito fibrinoide.....	64
Figura 13 –	Exame anatomopatológico: Coloração para demonstrar o comprometimento da lâmina elástica interna (WUT, 400 μ m)...	64
Figura 14 –	Imuno-histoquímica anti-CD163: (A) Áreas imunomarcada em região perivascular (200 μ m). (B) Detalhe das células imunomarcadas (200 μ m).....	65

Figura 15 – Imuno-histoquímica anti-CD163: Áreas imunomarcadas em região perivascular (300µm).....	65
Figura 16 – Imuno-histoquímica anti-CD206: Áreas imunomarcadas em região perivascular (300µm).....	66
Figura 17 – Imuno-histoquímica anti-CD206: Detalhe das células imunomarcadas (100µm).....	66
Figura 18 – Imuno-histoquímica anti-CMAF: Detalhe das células imunomarcadas (200µm).....	67
Figura 19 – Imuno-histoquímica anti-CMAF: Áreas imunomarcadas em região perivascular e tecido subcutâneo (300µm).....	67
Figura 20 – Imuno-histoquímica anti-STAT1: Ausência de áreas imunomarcadas em região perivascular (300µm).....	68
Figura 21 – Imuno-histoquímica anti-STAT1: Ausência de marcação (300µm).....	68
Figura 22 – Imuno-histoquímica anti-NALP1: Ausência de áreas imunomarcadas (300µm).....	69
Figura 23 – Imuno-histoquímica anti-NALP3: Ausência de áreas imunomarcadas (300µm).....	69
Figura 24 – Boxplots dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar macrófagos M1 e M2 nos pacientes do grupo PANC.....	70
Figura 25 – Boxplots dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar os macrófagos M1 e M2. Diferença entre os grupos PANC e controle.....	71
Figura 26 – Diferença da mediana entre os percentuais de área imunomarcada para cada anticorpo entre os pacientes dos grupos PANC e controle.....	71
Figura 27 – Boxplots dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar a ativação do inflamassoma. Diferença entre os grupos PANC e controle....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Nomenclatura das vasculites segundo a Conferência de Nomeclatura do Consenso Internacional de Chapel Hill de 2012.....	27
Quadro 2 – Critérios diagnósticos de PANC.....	40
Quadro 3 – Painel de anticorpos utilizados.....	53
Quadro 4 – Principais dados epidemiológicos e clínicos de pacientes com PANC publicados na literatura.....	79
Quadro 5 – Vasculites associadas a macrófagos e seu fenótipo.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Idade dos pacientes do grupo PANC e Controle.....	58
Tabela 2 – Distribuição dos pacientes do grupo PANC e Controle de acordo com o sexo.....	59
Tabela 3 – Manifestações clínicas e distribuição das lesões cutâneas.....	60
Tabela 4 – Resumo dos principais dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com PANC.....	62
Tabela 5 – Medidas resumo dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar macrófagos M1 e M2.....	70
Tabela 6 – Medidas resumo dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar a ativação do inflamassoma.....	72

RESUMO

Marques GF. Avaliação das populações de macrófagos de fenótipo M1/M2 e marcadores de ativação do inflamassoma em pacientes com poliarterite nodosa cutânea. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: A poliarterite nodosa cutânea (PANC) ou arterite cutânea é uma rara forma de vasculite que compromete artérias de pequeno e médio calibre da junção dermo-hipodérmica e tecido celular subcutâneo. Atualmente, acredita-se que a doença seja mediada por imunocomplexos, mas pouco se sabe a respeito da sua real etiologia. **OBJETIVO:** Estudar as populações de macrófagos de fenótipo M1/M2 e marcadores de ativação do inflamassoma em pacientes com PANC. **MÉTODOS:** Foram selecionados 14 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de PANC, cujos dados epidemiológicos, clínicos e de exames laboratoriais foram coletados a partir dos prontuários médicos. Em seguida, foram feitos cortes histológicos a partir dos blocos de parafina da biópsia de pele dos pacientes com PANC e de mais 9 controles sem doença para a realização das reações de imuno-histoquímica. Os macrófagos M1 foram demonstrados pela expressão do STAT1, enquanto os macrófagos M2 foram evidenciados pelos marcadores CD163, CD206 e CMAF. A ativação do inflamassoma foi demonstrada pelos anticorpos NALP1, NALP3, IL1-beta e caspase 1. **RESULTADOS:** Houve predomínio da doença em pacientes do sexo feminino com idade média de 39 anos. As principais lesões dermatológicas registradas foram úlceras, nódulos subcutâneos, livedo racemosa, lesões do tipo atrofia branca e púrpuras, e em todos os casos os membros inferiores estavam acometidos. A imunofluorescência direta foi positiva em 88,9% dos casos. A análise imuno-histoquímica das biópsias de pacientes do grupo PANC evidenciou ausência de macrófagos M1 e aumento no percentual de macrófagos M2 em relação ao grupo controle. A análise dos marcadores de ativação do inflamassoma foi negativa. **CONCLUSÃO:** A presença de macrófagos M2 sugere uma provável influência da imunidade inata na fisiopatologia da PANC e representa um novo campo de pesquisa para elucidar diversas questões que permanecem pendentes sobre a etiologia da doença, podendo ainda gerar potenciais alvos terapêuticos no futuro.

Descritores: Poliarterite nodosa; Arterite; Vasculite; Macrófagos; Ativação de Macrófagos; Inflamassomos; Imunidade Inata.

ABSTRACT

Marques GF. Study of macrophage polarization and inflammasome activation in patients with cutaneous polyarteritis nodosa. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020

INTRODUCTION: Cutaneous polyarteritis nodosa (CPAN) or cutaneous arteritis is a rare form of cutaneous vasculitis that affects small and medium sized arteries of the dermo-hypodermic junction and subcutaneous tissue. Despite the good prognosis, there are cases of difficult management with major complications. Currently, it is believed that the disease is mediated by immune complexes, but little is known about its real etiology. **OBJECTIVE:** To study the populations of macrophages of phenotype M1 / M2 and markers of inflammasome activation in CPAN patients. **METHODS:** 14 patients with clinical and histopathological diagnosis of CPAN were selected, whose epidemiological, clinical and laboratory exams data were collected from medical records. Then, histological cuts were made from the paraffin blocks of patients' skin biopsy and also from 9 controls without known disease to perform immunohistochemical reactions. The M1 macrophages were demonstrated by STAT1 expression, while the M2 macrophages were shown by the CD163, CD206 and CMAF markers. The activation of the inflammasome was demonstrated by the antibodies NALP1, NALP3, IL1beta and caspase 1. **RESULTS:** There was a predominance of the disease in female patients with an average age of 39 years. The main dermatological lesions recorded were ulcers, subcutaneous nodules, livedo racemosa, white atrophy scars and purple lesions, and in all cases the lower limbs were affected. Direct immunofluorescence was positive in 88.9% of cases. The immunohistochemical analysis of the CPAN patients' biopsies showed an absence of M1 macrophages and an increased percentage of M2 macrophages compares to the control group. The analysis of inflammasome activation markers was negative. **CONCLUSION:** The presence of M2 macrophages suggests a probable influence of innate immunity on the pathophysiology of PANC and represents a new field of research to elucidate several questions that remain pending on the etiology of the disease, which may also generate potential therapeutic targets in the future.

Descriptors: Polyarteritis Nodosa; Arteritis; Vasculitis; Macrophages; Macrophage Activation; Inflammasomes; Immunity, Innate.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A poliarterite nodosa cutânea (PANC) é uma vasculite necrotizante das artérias de médio calibre que acomete predominantemente a junção dermo-hipodérmica e tecido celular subcutâneo da pele, sem comprometimento de órgãos internos. É uma doença rara, de curso crônico e benigno, com número variável de exacerbações, que afeta pessoas de todas as idades, desde crianças até idosos, com predomínio em mulheres. Sua incidência e prevalência são desconhecidas.^{1,2}

Atualmente, admite-se que a PANC seja uma entidade mediada por imunocomplexos, uma vez que a presença de depósitos de IgM e C3 na parede das artérias afetadas é um achado comum no exame de imunofluorescência direta. Entretanto, a quantidade de trabalhos disponíveis sobre o tema é limitada e pouco se sabe a respeito da real etiologia e fisiopatologia da doença, o que dificulta o desenvolvimento de tratamentos específicos.³⁻⁵

A participação de diferentes tipos de células na inflamação vascular tem sido alvo de estudos e, nesse contexto, os macrófagos surgem como ponto chave no desenvolvimento de um amplo espectro de doenças, que contempla desde alterações lentamente progressivas como a aterosclerose, até quadros agudos e graves de vasculites sistêmicas.^{6,7}

Os macrófagos desempenham um papel crítico no desenvolvimento da resposta imunitária devido a sua atuação como primeira linha de defesa ao detectar e eliminar partículas “estranhas” (microrganismos, macromoléculas tóxicas, células senescentes ou em processo de morte celular). Durante a resposta imune adaptativa, os macrófagos apresentam antígenos aos linfócitos T por meio de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e/ou I, e colaboram com a resposta imune humoral na eliminação de agentes estranhos. Ademais, os macrófagos têm um papel importante de reparação de feridas e resolução da inflamação, promovendo o recrutamento de outras células inflamatórias no local dos focos de inflamação, assim como o

remodelamento da matriz extracelular e angiogênese.^{8,9}

De forma análoga a divisão de linfócitos em Th1 e Th2, a ativação dos macrófagos pode ser classificada em clássica (M1) e alternativa (M2), que diferem quanto ao estado de polarização e funções imunológicas dependendo, primordialmente, do microambiente e dos microrganismos que interagem com essas células no tecido.¹⁰⁻¹³

Os macrófagos M1 produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias mediante patógenos resistentes e exibem propriedades antimicrobianas, porém, estes efeitos também contribuem para destruição tecidual. Já os macrófagos M2 são peças fundamentais na resposta imune a parasitas, doenças alérgicas, remodelação tecidual e angiogênese, sendo considerados células anti-inflamatórias.^{11,13}

Apesar da sua enorme importância fisiológica, acredita-se que os macrófagos possam causar lesão em tecidos normais durante diversas condições patológicas. O pressuposto que consolida essa ideia é o fato dessas células possuírem um grande número de enzimas extremamente lesivas dentro de seus lisossomos, tais como proteases neutras, metaloproteinases e elastase, que podem ser liberadas para o parênquima tecidual intacto durante a atividade dessas células, causando degradação de colágeno, elastina e fibrina. Macrófagos podem liberar citocinas inflamatórias, radicais livres e óxido nítrico, os quais podem mediar a lesão tecidual relacionada à resposta inflamatória.^{7,10,14}

No que diz respeito às vasculites, os macrófagos podem atuar tanto na formação de granulomas como no processo de hiperplasia da íntima e oclusão intraluminal, que compromete o fluxo sanguíneo e causa as complicações isquêmicas típicas das vasculites.⁶

O estudo da polarização dos macrófagos já foi realizado em diferentes tipos de vasculites. Em 2014, Ohlsson et al observaram o predomínio de macrófagos M2 em 23 pacientes diagnosticados com vasculites associadas ao ANCA em comparação com o grupo controle.¹⁵ A prevalência do subtipo M2 também foi constatada em lesões de vias aéreas superiores de pacientes com diagnóstico de granulomatose com poliangiite e nos sítios de necrose fibrinoide glomerular de pacientes com glomerulonefrite pauci-imune.^{16,17} Em pacientes

com púrpura de Henoch-Schönlein, a presença de macrófagos M2 no infiltrado túbulo intersticial foi associada a pior prognóstico, com maior chance de evolução para falência renal e formação de crescente.¹⁸

Estudo recente realizado em 2019 por Ohashi et al. revelou o predomínio de macrófagos M1 em cortes histológicos das artérias coronárias de pacientes com Doença de Kawasaki submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio para tratamento de aneurismas gigantes e estenose coronariana.¹⁹ Há ainda situações nas quais pode ser observada a presença tanto de macrófagos M1 como de M2, tal qual constatado em estudo realizado com pacientes diagnosticados com arterite de células gigantes.²⁰ Entretanto, até o presente momento, nenhum estudo da polarização de macrófagos em pacientes com PANC foi realizado.

Outro argumento que torna relevante o estudo dos macrófagos na PANC é o fato dessa doença ter sido recentemente associada ao espectro de manifestações clínicas observadas em pacientes com deficiência da adenosina deaminase 2 (ADA2), a qual resulta de uma mutação autossômica recessiva no gene *cat eye syndrome chromosome region candidate 1* (CERC1).^{21–23} Segundo o adendo dermatológico incorporado à última Conferência de Nomenclatura das vasculites do Consenso Internacional de Chapel Hill, pacientes com deficiência de ADA2 que se apresentam com fenótipo de PAN são considerados portadores de uma rara forma geneticamente determinada de PAN, cuja gravidade pode variar desde um quadro de vasculite cutânea (PANC) até uma vasculite sistêmica.²⁴

Sabe-se que a ADA2 é uma enzima expressa predominantemente em monócitos e em outras células da linhagem mieloide que exerce uma atividade autócrina, sendo capaz de induzir a proliferação de monócitos e a polarização de macrófagos. A deficiência de ADA2 está associada a um defeito na diferenciação de macrófagos M2, o que determina a prevalência de macrófagos M1 que promovem inflamação e dano tecidual.^{25–27}

Diante à falta de novas informações a respeito da fisiopatogenia da PANC, o estudo da ativação e comportamento dos macrófagos em pacientes com a doença surge como um novo campo de pesquisa que pode ajudar a decifrar a patogênese do processo inflamatório envolvendo as artérias de

médio calibre característico dessa vasculite cutânea.

Além dos macrófagos, outro elemento da imunidade inata que vem sendo associado a diversas doenças inflamatórias é o inflamassoma, um complexo multiprotéico oligomérico, expresso em diferentes tipos celulares, epitélios e tecidos restritos, que atua na regulação da morte celular e da reparação tecidual. Atualmente, existem seis inflamassomas distintos caracterizados: o NLRP1 (ou NALP1), NLRC4 (ou IPAF), NLRP6, NLRP12, AIM2 e NLRP3 (ou NALP3).²⁸⁻³⁰ Destes, o inflamassoma de NLRP3 é o mais bem estudado devido sua associação com importantes doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, tais como Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, arteriosclerose e doenças intestinais, assim como doenças autoimunes. Trabalhos da literatura já relataram associação de alterações genéticas de componentes do inflamassoma à suscetibilidade, atividade e respostas ao tratamento de doenças como artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, vitiligo, psoríase, esclerose múltipla, espondilite anquilosante, doença de Crohn, doença de Addison, entre outras.^{28,31-38}

A detecção de marcadores do inflamassoma vem a ser um ponto importante para esclarecer a fisiopatologia de várias desordens autoimunes e/ou autoinflamatórias que permanecem obscuras, como é o caso da PANC. Com base nessas informações, propõem-se um estudo com objetivo de estudar a polarização dos macrófagos e a ativação do inflamassoma nos pacientes com PANC.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Estudar as populações de macrófagos de fenótipo M1/M2 e marcadores de ativação do inflamassoma em pacientes com diagnóstico de PANC.

2.2 Objetivo secundário

Avaliar as características epidemiológicas e clínicas, exames laboratoriais e de imunofluorescência direta dos pacientes com diagnóstico de PANC.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Definição, nomenclatura e classificação das vasculites

As vasculites representam um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório comprometendo a parede dos vasos de diferentes órgãos e sistemas, podendo resultar em estenose, obstrução e trombose, com consequente isquemia tissular, aneurisma ou hemorragia. As manifestações clínicas e a gravidade dependem do tamanho, local e extensão do comprometimento do leito vascular.³⁹

Com o objetivo chegar a um consenso sobre os nomes das formas mais comuns de vasculites e formular uma definição específica para cada uma, em 1994, foi realizada a primeira Conferência de Nomenclatura do Consenso Internacional de Chapel Hill.⁴⁰ Com o avanço do conhecimento acerca das vasculites, em 2012, esse consenso foi revisado com o intuito de alterar nomes e definições conforme apropriado, assim como adicionar importantes categorias de vasculites não incluídas anteriormente. Além disso, houve um esforço para que os epônimos fossem substituídos por termos que representassem o avanço no estudo da fisiopatogenia das vasculites.⁴¹

De acordo com a última Conferência de Nomenclatura do Consenso Internacional de Chapel Hill, as vasculites podem ser categorizadas em vasculites de grandes vasos, vasculites de médios vasos, vasculites de pequenos vasos, vasculites de vasos com calibre variado, vasculites de órgão único, vasculites associadas à doenças sistêmicas e vasculites associadas à etiologia provável (Figuras 1 e 2, e Quadro 1).⁴¹⁻⁴³

É válido ressaltar que a nomenclatura proposta pela Conferência de Nomenclatura do Consenso Internacional de Chapel Hill não deve ser utilizada com o intuito classificatório ou diagnóstico. Trata-se de um sistema de nomenclatura apenas que visa especificar o nome a ser utilizado para um processo patológico definido.⁴¹

A. Grande calibre **B. Médio calibre** **C. Pequeno calibre**

FONTE (adaptado de): Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):1-11.

Figura 1 – Tipos de vasos definidos como vasos de grande (A), médio (B) e pequeno calibre (C) de acordo com o sistema de nomenclatura instituído na Conferência Internacional de Consenso de Chapel Hill em 2012. O rim é usado para exemplificar vasos médios e pequenos. Os grandes vasos são a aorta, seus principais ramos e veias análogas. Os vasos médios são as principais artérias e veias viscerais e seus ramos iniciais. Pequenos vasos são artérias intraparenquimatosas.

FONTE (adaptado de): Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):1-11.

Figura 2 – Classificação das vasculites de acordo com o calibre dos vasos predominantemente acometidos.

Quadro 1 – Nomenclatura das vasculites segundo a Conferência de Nomenclatura do Consenso Internacional de Chapel Hill de 2012.

Vasculites de grandes vasos

Arterite de células gigantes

Arterite de Takayasu

Vasculites de médios vasos

Poliarterite nodosa

Doença de Kawasaki

Vasculites de pequenos vasos

Vasculites associadas aos anticorpos anticitoplasma de neutrófilos

Poliangiite microscópica

Granulomatose com poliangiite (Wegener)

Granulomatose eosinofílica com poliangiite (Churg-Strauss)

Vasculites por imunocomplexos

Doença antimembrana basal glomerular

Vasculite crioglobulinêmica

Vasculite por IgA (Henoch-Schönlein)

Urticária vasculite hipocomplementêmica (Vasculite anti-C1q)

Vasculite de vasos com calibre variado

Doença de Behçet

Síndrome de Cogan

Vasculites de órgão único

Angiite leucocitoclástica cutânea

Arterite cutânea

Vasculite primária do sistema nervoso central

Aortite isolada

Outras

Vasculites associadas à doenças sistêmicas

Vasculite lúpica

Vasculite reumatoide

Vasculite sarcoídea

Outras

Vasculites associadas à etiologia provável

Vasculites crioglobulinêmicas associadas ao vírus da hepatite C

Vasculites associadas ao vírus da hepatite B

Aortite associada à sífilis

Vasculites por imunocomplexos associadas às drogas

Vasculites associadas ao ANCA associadas às drogas

Vasculites associadas ao câncer

Outras

FONTE (adaptado de): Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. Arthritis Rheum. 2013;65(1):1-11

3.2 Poliarterite nodosa cutânea

A primeira vasculite sistêmica descrita na literatura mundial foi a poliarterite nodosa (PAN) clássica. Em 1866, Kussmaul e Maier relataram uma condição fatal caracterizada por uma vasculite envolvendo as artérias de médio calibre da pele, músculos, rins, trato gastrointestinal e sistema nervoso periférico, a qual foi originalmente denominada “periarterite nodosa”. Em 1903, Ferrari descreveu a origem transmural do processo inflamatório envolvendo as artérias de médio calibre e propôs o termo “poliarterite nodosa”. Entretanto, foi apenas em 1931 que Lindberg reconheceu a existência de uma variante cutânea da PAN.^{2,44}

Segundo a Conferência Internacional de Consenso de Chapel Hill de 2012, por se tratar de enfermidade que envolve artérias e arteríolas da derme e junção dermo-hipodérmica, sem comprometimento de órgãos internos, a variante cutânea da PAN foi enquadrada no grupo das vasculites de órgão único e recebeu o nome de arterite cutânea. O termo PANC é tido como sinônimo e, por se tratar de um nome já consagrado, muitos estudos continuam empregando essa nomenclatura.²⁴

Dados epidemiológicos da PAN já foram avaliados em diferentes países europeus. Na Espanha estima-se que a incidência anual seja de 0,6 casos por milhão de habitantes, com de prevalência de 2,6 casos por milhão de habitantes.⁴⁵ Na França e na Suécia a prevalência estimada foi de aproximadamente 31 casos por milhão de habitantes, enquanto na Eslovênia e na Suécia a incidência foi de 0,95 e 1,6 casos por milhão de habitantes/ano respectivamente.^{46–49} A maior incidência registrada foi de 8 casos por milhão de habitantes/ano em estudo realizado no Reino Unido.⁵⁰ Já na Polônia, foi constatada diminuição da incidência anual de 3,3 casos por milhão de habitantes em 2008 para 1,9 em 2013.⁵¹

A variante cutânea da PAN é uma doença ainda mais rara. Um estudo retrospectivo realizado em um hospital pediátrico na China verificou que dos 1896 pacientes diagnosticados com vasculites primárias, no período entre 1999 e 2013, apenas quatro tinham diagnóstico compatível com PANC.⁵² Em Jerusalém (Israel), um levantamento epidemiológico de pacientes

diagnosticados com vasculites primárias em um período de 20 anos identificou 17 casos de PAN, sendo que destes, apenas três foram classificados como PANC.⁵³ Entretanto, diante da escassez de informações sobre o tema, até hoje não há dados concretos sobre a real incidência e prevalência da doença.⁴⁴

A PANC é uma enfermidade que tem curso crônico e benigno, com número variável de exacerbações. Afeta pessoas de todas as idades, desde crianças até idosos, com predomínio em pacientes do sexo feminino. A diferença de prevalência entre os sexos pode chegar a alcançar a proporção de um homem para cada 13 mulheres acometidas.^{1,5,54} Esses dados podem ser diferentes em amostras que contemplem apenas pacientes pediátricos, tendo um estudo registrado prevalência da doença no sexo masculino em crianças com idade inferior a 10 anos.⁵⁵

A etiologia da PANC permanece obscura, porém admite-se que seja uma entidade mediada por imunocomplexos uma vez que é comum observarmos a presença de depósitos de IgM e C3 na parede das artérias afetadas. Achados de imunofluorescência direta positiva tanto em vasos superficiais como em vasos profundos da derme sugerem que, apesar da PANC ser caracterizada como uma panarterite, ocasionalmente vasculite de pequenos vasos pode ser evidenciada.^{3,4,56}

A presença de imunocomplexos também já foi relatada no soro humano em estudo realizado por Kawakami et al, o qual evidenciou anticorpos contra o complexo de fosfatidilserina/protrombina (PS/PT) do tipo IgM em 81,3% dos pacientes com PANC e do tipo IgG em 31,3% dos casos. Tais achados geraram a hipótese de que o complexo PS/PT, formado a partir da apoptose das células endoteliais, desencadearia uma resposta imune com a formação de anticorpos anti-PS/PT, os quais ativariam a via clássica do complemento causando uma inflamação descontrolada na parede dos vasos de médio calibre característica da PANC.³

Fosfolípides aniônicos como a cardiolipina e a fosfatidilserina não são expressos na superfície de células normais. Eles são translocados para a superfície da membrana plasmática das células durante a apoptose, que pode ser deflagrada por mecanismos extrínsecos ou intrínsecos. A via extrínseca tem como marco inicial a ativação dos receptores da morte presentes na

superfície celular em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria dos receptores da morte identificados é membro da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), entre eles o receptor Fas (CD95 ou APO-1). Quando o ligante-Fas se acopla ao receptor Fas, as moléculas individuais do receptor se arranjam em trímeros, formando um agregado de “cadeias da morte” que se ligam a uma proteína adaptadora presente no citosol. A ligação desse complexo à pro-caspase-8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase-8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (caspase efetora).⁵⁷

A via intrínseca da apoptose é deflagrada por sinais de estresse intracelular que resultam em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene p53), alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH e estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento. Na presença de sinais de estresse intracelular ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para a mitocôndria. A translocação dessas proteínas para a mitocôndria resulta na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, liberando para o citosol o citocromo-c. No citosol, a associação do citocromo-c ao fator ativador da apoptose 1 (Apaf1) forma um complexo denominado apoptossomo, levando à ativação da caspase-9 que então ativará a caspase-3.⁵⁷

As caspases efetoras, por fim, deslocam o fosfolípídeo fosfatidilserina do interior da membrana plasmática para fora dela com a exposição da fosfatidilserina ao ambiente externo. Esta modificação da estrutura celular sinaliza o seu suicídio ao ambiente. Estudos recentes demonstram que a protrombina se une a fosfatidilserina formando um complexo com ação procoagulante que induz a formação de anticorpos anti-PS/PT na membrana das células endoteliais ativadas (Figura 3). Esse mecanismo poderia justificar o encontro de anticorpos anti-PS/PT em pacientes com PANC.^{3,57}

FONTE: Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? Blood. 2010;116(12):2011-2018.

Figura 3 – Mecanismo de morte celular por apoptose com translocação do fosfolípídeo fosfatidilserina (PS) para a superfície da membrana plasmática.

Uma possível influência genética vem sendo discutida em estudos recentes que incluem a PANC no espectro das manifestações associadas a deficiência da ADA2, uma isoenzima expressa predominantemente em monócitos e macrófagos.^{22,23,58} A ADA2 é secretada pelas células mielóides para o espaço extracelular onde participa do metabolismo das purinas, catalisando de forma irreversível o nucleosídeo adenosina e o 2' desoxiadenosina em inosina e 2' desoxinosina. Sua atividade é influenciada pela temperatura e pH do espaço extracelular, estando aumentada na vigência

de altas temperaturas e pH ácido, o que sugere a participação da enzima ADA2 em condições de hipóxia, oncogênese e inflamação (Figura 4).^{25,27}

A ADA2 atua como fator de crescimento desempenhando um papel central no desenvolvimento de células endoteliais e hematopoiéticas. Ao ser secretada, promove a proliferação de monócitos e diferenciação de macrófagos, regulando ainda o balanço entre células inflamatórias (M1) e anti-inflamatórias (M2). Pacientes com deficiência de ADA2 apresentam um defeito na diferenciação de macrófagos M2, com consequente prevalência de células M1, as quais liberam citocinas pró-inflamatórias que promovem inflamação e dano tecidual. Ademais, a ADA 2 parece ser peça fundamental na manutenção da integridade vascular. Outro possível mecanismo secundário à deficiência de ADA2 é o aumento da expressão gênica de proteínas pró-inflamatórias em neutrófilos, tais como a mieloperoxidase (MPO), além da ativação de neutrófilos, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias com subsequente dano tecidual (Figura 4).^{25,26}

A deficiência de ADA2 é causada por uma mutação autossômica recessiva no gene CERC1, localizado no cromossomo 22q11, que determina a perda de função da enzima ADA2. Desde a primeira descrição da doença que ocorreu em 2014, mais de 160 casos já foram relatados. Pacientes com deficiência de ADA2 podem apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas que incluem febre, livedo racemosa, hepatoesplenomegalia, hipogamaglobulinemia, infartos lacunares, síndrome de Sneddon e PAN. Acredita-se que a deficiência de ADA2 seja a causa de uma rara forma geneticamente determinada de PAN, cuja apresentação clínica pode variar desde um quadro de PANC até um quadro de vasculite sistêmica com evolução fatal.^{21-23,26,27}

Assim como em outras formas de vasculite, a presença de disfunção endotelial na PANC reflete uma ativação direta das células endoteliais e consequente dano, o qual pode ser secundário à vasculite inflamatória primária ou à anticorpos e citocinas inflamatórias. As células endoteliais ativadas podem, então, perpetuar e potencializar o processo inflamatório através da produção de citocinas e moléculas de adesão.^{3,59}

FONTE: Caorsi R, Penco F, Schena F, Gattorno M. Monogenic polyarteritis: the lesson of ADA2 deficiency. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2016;14(1).

Figura 4 – Produção e papel fisiológico da ADA2: É uma isoenzima produzida e secretada por células mieloides, que exerce sua atividade enzimática no espaço extracelular, principalmente na presença de pH baixo ou altas temperaturas. (A) Nos monócitos, a ADA2 atua como fator de crescimento: induz a proliferação de monócitos e promove a diferenciação de macrófagos anti-inflamatórios M2. (B) Nos neutrófilos, a ADA2 induz a expressão de proteínas pró-inflamatórias, como a mieloperoxidase (MPO), e a ativação de neutrófilos, levando à secreção de citocinas pró-inflamatórias. (C) Existem ainda evidências indiretas de uma possível atuação da ADA2 como fator de crescimento para células endoteliais, exercendo um papel fundamental na manutenção da integridade vascular.

Várias enfermidades infecciosas têm sido associadas ao início e às recaídas dos episódios de PANC, sendo o estreptococo beta-hemolítico do grupo A o agente etiológico mais comumente identificado, principalmente em pacientes com idade inferior a 10 anos. História prévia de infecção do trato respiratório superior causada por estreptococo foi documentada em crianças e adultos com PANC a partir da dosagem dos títulos do anticorpo antiestreptolisina O (ASLO) ou por cultura de swab de orofaringe. Há ainda relatos de PANC secundárias à outras infecções estreptocócicas como

glomerulonefrite, febre reumática e fascíte necrotizante.^{55,60-64} Apesar da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) ser classicamente associada à forma sistêmica da PAN, atualmente, alguns casos da variante cutânea têm sido descritos em pacientes portadores do HBV. Entretanto, a relação do vírus com a PANC ainda não está clara.⁶⁵⁻⁶⁸ Após introdução da vacina contra o HBV no calendário vacinal surgiram relatos de casos tanto de PAN sistêmica como de PANC secundários à vacina.^{69,70} Outros agentes infecciosos possivelmente relacionados são o vírus da hepatite C (HCV), o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o Parvovírus B19 e o *Mycobacterium tuberculosis*.⁷¹⁻⁷⁵

A PANC também já foi associada à enfermidades não infecciosas. Há relatos de casos secundários à doenças autoimunes como miastenia gravis, doença de Crohn, retocolite ulcerativa e hepatite autoimune, assim como relatos associados à neoplasias, trombose de veia cava e vacinas contra difteria e tétano.⁷⁶⁻⁸⁰ Fármacos como penicilina e tetraciclina também estão entre os agentes causadores de PANC, sendo a minociclina a principal droga envolvida. Nestes pacientes, em geral as lesões cutâneas costumam regredir após a suspensão da medicação.^{81,82}

As manifestações clínicas características de PANC são os nódulos subcutâneos, com estudos chegando a relatar sua presença em até 100% dos casos. Os nódulos costumam ser dolorosos e bilaterais, variam de 0,5 a 3 cm de diâmetro, em quantidade que pode variar de poucos a mais de cem. São lesões mais palpáveis do que visíveis ao exame físico e podem evoluir com ulceração, presente em até 50% dos casos, o que provavelmente ocorre secundariamente ao processo inflamatório vascular e consequente isquemia (Figura 5).^{1,5,44,83,84}

O livedo racemosa é um dos achados dermatológicos mais observados nos quadros de PANC, presente em 40 a 85% dos casos, podendo por vezes ser a primeira manifestação da doença. É definido como um padrão de descoloração eritêmato-cianótica com aspecto rendilhado irregular, formado por arcos que se interligam de forma incompleta, podendo ocorrer de forma localizada, onde predominam as demais lesões cutâneas, ou se manifestar de forma disseminada, comprometendo tronco e membros em toda sua extensão (Figura 5).^{5,50,83,85,86}

Figura 5 – Manifestações cutâneas da PANC: (A) Livedo racemosa em membros inferiores e nódulo subcutâneo indicado pela seta; (B) Nódulos subcutâneos indicados por círculos e livedo racemosa exuberante; (C) Úlceras em dorso do pé e terço inferior da perna esquerda.

Atrofia branca (AB, *Atrophie Blanche*) é um termo utilizado para descrever cicatrizes atróficas branco nacaradas de formato estrelado e com telangiectasias finas, rodeadas por hiperpigmentação, caracterizadas nas doenças vasculo-oclusivas histologicamente por vasculopatia hialinizante segmentar dos vasos sanguíneos da derme com graus variáveis de depósito de fibrina intravascular. Cicatrizes do tipo AB foram inicialmente descritas na vasculopatia livedoide e durante muitos anos esses termos foram tidos como sinônimos. Entretanto, sabe-se hoje que a AB pode ocorrer em outras desordens como estase venosa, síndrome do anticorpo antifosfolípide e vasculites cutâneas, especialmente na PANC, podendo estar presente em mais de 40% dos casos.^{44,87,88}

Outros achados durante o exame dermatológico eventualmente observados nos pacientes com PANC são petéquias, púrpuras, necrose

cutânea, lesões urticariformes, bolhas e edema, sendo os membros inferiores o principal local de manifestação de todos os tipos de lesões cutâneas.^{1,2,44,86,89,90}

Apesar das lesões da PANC serem fundamentalmente limitadas à pele, alguns pacientes podem apresentar sintomas extracutâneos incluindo febre, perda ponderal, mialgia, artralgia, fadiga, letargia, acrocianose, fenômeno de Raynaud, neuralgia e neuropatia periférica. Distúrbios sensoriais como queimação, dormência e parestesia também são relatados. Mononeurite múltipla confirmada por eletroneuromiografia pode estar presente em até 20% dos casos.^{5,44,86}

Mediante um caso suspeito de PANC é essencial obter uma amostra de tecido com representação adequada da derme e hipoderme para estudo histopatológico. Em caso de ulceração recomenda-se a realização de biópsia incisional da borda da úlcera, a qual deve conter quantidade adequada do tecido central da úlcera, do tecido de pele normal e do tecido subcutâneo. Em caso de nódulo subcutâneo, deve-se objetivar a biópsia do nódulo inteiro ou a região central mais profunda do panículo onde em geral se encontra a artéria comprometida. Nos casos que se manifestam com livedo reticular é preferível realizar ao menos duas biópsias, uma na porção central de um dos arcos que compõem a trama reticular do livedo, onde está localizada a arteríola nutridora do segmento cutâneo corresponde, e outra na área periférica azulada. A realização de biópsias múltiplas e seriadas aumenta a acurácia do diagnóstico.^{83,88,91–93}

Histologicamente a PANC é caracterizada por vasculite necrotizante de artérias de médio e pequeno calibre, representada por necrose fibrinoide da parede vascular, espessamento subintimal e permeação da parede por infiltrado inflamatório com linfomononucleares e polimorfonucleares (Figura 6).^{83,85,94}

Figura 6 – Exame anatomopatológico (HE): (A) Artéria de médio calibre na junção dermo-hipodérmica (3mm); (B) No detalhe, necrose fibrinoide da parede vascular, espessamento subintimal, permeação da parede por infiltrado inflamatório e lúmen vascular preenchido por trombo de fibrina (300µm).

Dependendo do estágio evolutivo da doença, nem sempre todas essas características histológicas estão presentes concomitantemente. Tendo isso em mente, foi proposta uma divisão didática dos achados histopatológicos em quatro estágios evolutivos, baseada no tipo de infiltrado celular predominante, nas mudanças morfológicas na parede e lúmen vascular, e nas alterações perivasculares, podendo haver características de mais de um estágio na mesma biópsia (Figura 7):⁵⁴

1) Primeiro estágio (Agudo): Artérias musculares de pequeno calibre são afetadas na junção dermo-hipodérmica com predominância de infiltrado neutrofílico e poeira nuclear ao redor da parede dos vasos. A camada íntima apresenta perda ou dano parcial da camada de células endoteliais e o lúmen vascular é preenchido por trombo de fibrina acompanhado de neutrófilos e eritrócitos. A coloração de Van Gieson revela lâmina elástica interna sem alterações evidentes. Presença de necrose fibrinoide na camada média e destruição da camada muscular não são observadas neste estágio.⁵⁴

2) Segundo estágio (Subagudo): Trombo de fibrina no lúmen vascular e necrose fibrinoide na íntima estão presentes em associação com depósitos fibrinoides focais em áreas danificadas da camada média. Em alguns casos, observa-se imagem semelhante a um alvo formado por uma camada de necrose fibrinoide concêntrica subendotelial com uma camada interna formada por células endoteliais remanescentes e uma camada externa formada pela lâmina elástica interna. A coloração de Van Gieson evidencia extravasamento e descarga fibrinoide nas áreas de destruição da lâmina elástica interna que se estende através da média e áreas adjacentes. Neutrófilos entremeados por linfócitos e histiócitos compõem um infiltrado inflamatório moderado perivascular.⁵⁴

3) Terceiro estágio (Reparativo ou “Healing”): Lúmen vascular ocluído por trombo de fibrina residual e proliferação de fibroblastos na íntima. Formação de pequenos vasos é evidenciada na área perivascular. O infiltrado é composto predominantemente por linfócitos T e histiócitos dentro e ao redor da parede das artérias. Em contrapartida, são raros os neutrófilos e linfócitos B neste infiltrado.⁵⁴

4) Quarto estágio (“Healed”): Marcado pelo espessamento da íntima resultando em obliteração do lúmen associado a neovascularização na região perivascular. O infiltrado inflamatório é mínimo ou ausente ao redor da parede das artérias musculares.⁵⁴

FONTE (Adaptado de): Ishibashi M, Chen K-R. A morphological study of evolution of cutaneous polyarteritis nodosa. Am J Dermatopathol. 2008;30(4):319-326.

Figura 7 – Ilustração esquemática dos achados histopatológicos nos diferentes estágios evolutivos da PANC.

Não existem provas sorológicas específicas para PANC, o diagnóstico requer correlação clínico patológico. Assim sendo, em 2009 Nakamura et al propuseram os critérios diagnósticos que são utilizados até os dias atuais (Quadro 2). Para o diagnóstico de PANC devem estar presentes ambos os critérios, clínico e histológico, após excluir os sinais ou sintomas de afecção sistêmica.⁹⁵

Quadro 2 – Critérios diagnósticos de PANC.

Achados clínicos compatíveis	Nódulos subcutâneos, livedo, púrpuras, úlceras
Achados histopatológicos	Vasculite necrotizante de vasos de pequeno e médio calibre
Em pacientes sem afecção sistêmica deve ser descartado a presença de:	<ul style="list-style-type: none"> - Febre > 38° por mais de 15 dias; - Perda ponderal > 6 kg em 6 meses; - Hipertensão arterial; - Afecção renal; - Acidente vascular cerebral isquêmico ou hemorrágico; - Infarto agudo do miocárdio ou pericardite; - Pleurite - Isquemia ou hemorragia intestinal; - Neuropatia em território distante da zona de afecção cutânea; - Artralgias ou mialgias generalizadas; - Arteriografia com alterações sugestivas de microaneurismas múltiplos, estenoses ou obliteração

FONTE (adaptado de): Nakamura T, Kanazawa N, Ikeda T, et al. Cutaneous polyarteritis nodosa: revisiting its definition and diagnostic criteria. Arch Dermatol Res. 2009;301(1):117-121.

Exames complementares laboratoriais e de imagem devem ser solicitados para descartar afecção sistêmica, investigar possíveis agentes etiológicos envolvidos, avaliar o prognóstico da doença e excluir diagnósticos diferenciais. A ultrassonografia vascular com Doppler colorido das artérias renais é realizada para excluir a presença de aneurismas ou estenoses nesses vasos. Eletromiografia, dosagem enzimas musculares e estudos de condução nervosa são úteis nos casos com queixa de mialgia, diminuição de força muscular e sintomas parestésicos. Em pacientes com dor abdominal ou com exame de sangue oculto nas fezes positivo é recomendado avaliação com colonoscopia e angiografia mesentérica.

Para investigar possíveis agentes etiológicos é necessário solicitar sorologias para HBV, HCV e HIV. Dosagem dos títulos do ASLO e cultura de swab de orofaringe podem ser realizadas para documentar infecção estreptocócica em casos com história prévia de infecção do trato respiratório

superior. Embora a associação da PANC com trombofilias seja excepcional, é sempre de bom tom realizar a pesquisa de estados de hipercoagulabilidade na vigência de quadros de vasculites. Hemograma completo e dosagem de Proteína C Reativa (PCR) são úteis para avaliar o prognóstico da doença. Outros exames deverão ser solicitados na vigência de sinais ou sintomas específicos que requeiram investigação.^{3,44,88,96,97}

O principal diagnóstico diferencial a ser feito é com a própria forma sistêmica da PAN, que clinicamente pode se apresentar com quadro cutâneo idêntico ao da PANC, mas com comprometimento de órgãos internos. Doenças que cursam com nódulos subcutâneos ou ulcerações de extremidades inferiores devem ser incluídas no diagnóstico diferencial, tais como vasculopatia livedoide, eritema nodoso, vasculite nodular, tromboflebite superficial, vasculites associadas ao ANCA, arterite macular e febre reumática. Além destas, outras vasculites requerem distinção, dentre as quais, poliangiite microscópica, granulomatose de Wegener (Granulomatose com poliangiite), síndrome de Churg-Strauss (Granulomatose eosinofílica com poliangiite), eritema indurado de Bazin e urticária vasculite (vasculite urticariforme).^{1,84,94,98}

Por ser uma patologia crônica e recidivante, os casos leves de PANC que cursam com nódulos e livedo podem ser tratados com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), por suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, ácido acetilsalicílico (AAS), indometacina ou colchicina. Corticoides tópicos como furoato de mometasona 0.1% sob oclusão são efetivos em casos leves com eritema, alcançando remissão completa em quatro semanas.⁹⁹ Também já foi descrito o uso de valerato de diflucortolona durante as exacerbações, três vezes por dia durante duas a três semanas, com remissão completa dos sintomas.^{100,101}

Pacientes refratários ao tratamento conservador e aquelas com quadro clínico exuberante, que evoluem com dor, ulceração, necrose ou sintomas extracutâneos como mialgias, parestesias e artralgias, podem exigir medidas mais agressivas. Nesses casos, os corticosteroides sistêmicos são indicados, com controle das exacerbações agudas já comprovado. A prednisolona na dose igual ou inferior a 30 mg por dia é muitas vezes eficaz, mas alguns casos requerem a dosagem de 1 mg/kg/dia. Infelizmente, recidivas podem ocorrer

durante a redução da dose dos corticosteroides e os efeitos adversos limitam o seu uso a longo prazo.^{1,100}

A associação de medicamentos pode ser necessária para manter o controle da doença e evitar recidivas durante a retirada dos corticoesteroides. Entre os agentes utilizados com esse objetivo estão os AINEs, colchicina, hidroxicloroquina, dapsona, azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato, micofenolato de mofetila, ciclosporina, sulfapiridina, pentoxifilina, imunoglobulina intravenosa e biológicos como infliximab, rituximab, tocilizumab e etanercept. Estes fármacos são utilizados em conjunto com corticoesteroides e podem ser continuados após a sua suspensão.^{86,102-108}

Em pacientes com antecedente de infecção estreptocócica está indicado o uso de penicilina benzatina (600.000 a 1.200.000 UI de acordo com o peso corporal). A profilaxia pode ser necessária nos casos cujas recaídas sejam desencadeadas por infecções estreptocócicas recorrentes, entretanto, estas podem ocorrer mesmo em uso de profilaxia. A amigdalectomia pode ser considerada em casos selecionados.¹⁰⁹

É ainda previsto o emprego de terapias que melhorem a perfusão tecidual (anticoagulantes, trombolíticos, medicamentos antiplaquetários, vasodilatadores) uma vez que já está documentada a presença de oclusão microvascular em pacientes com PANC, bem como pela detecção dos anticorpos anti-PS/PT, membros da família dos anticorpos antifosfolípides, que favorecem a trombose arterial e venosa.^{110,111}

O prognóstico da PANC é favorável, sem casos de morte documentados pela doença em si e raros casos relatados de progressão para a forma sistêmica. Pacientes com úlceras tendem a apresentar um pior prognóstico e maior número de recidivas em comparação com aqueles sem úlceras. A doença tem curso crônico, com exacerbações e remissões, que podem ocorrer espontaneamente ou serem desencadeados por outras enfermidades e agentes infecciosos. O tratamento acelera a recuperação e melhora os sintomas constitucionais e cutâneos da doença, que tem resolução insidiosa após período variável de tempo.^{44,83,96}

3.2 Macrófagos

Os monócitos são células que se originam da medula óssea a partir de um precursor mielóide e são liberadas na corrente sanguínea onde constituem 10% dos leucócitos circulantes em humanos. No sangue periférico, estas células têm uma meia-vida relativamente curta (24–72 horas) e migram para diferentes tecidos onde se transformam em macrófagos e células dendríticas. Os monócitos são heterogêneos em termos de morfologia, marcadores de superfície e capacidade fagocítica, e exibem uma elevada plasticidade em seu processo de diferenciação que é tecido estímulo dependente. Como consequência, o fenótipo e as funções efectoras dos macrófagos residentes em diferentes tecidos (macrófagos alveolares, células de Kupffer, micróglia, osteoclastos) também variam consideravelmente (Figura 8).^{13,112}

O termo macrófago agrupa uma multiplicidade de células cuja finalidade é a manutenção da homeostase e integridade tecidual. Macrófagos são responsáveis pela fagocitose de patógenos, debris celulares e de células mortas ou infectadas, apresentam antígenos por meio do complexo MHC e produzem diferentes tipos de citocinas. Entretanto, em determinadas situações, os macrófagos podem contribuir para o dano tecidual durante infecções e doenças inflamatórias.^{8,10,11,14}

A polarização dos macrófagos é um processo pelo qual estas células assumem uma resposta funcional e fenótipo específico de acordo com os estímulos e sinais emitidos pelo microambiente onde se encontram. Várias classes de macrófagos já foram descritas em humanos e em modelos experimentais com base na expressão de seus marcadores de superfície celular, produção de fatores específicos e atividades biológicas. As duas subpopulações principais incluem os macrófagos inflamatórios ou ativados pela via clássica (M1) e os macrófagos anti-inflamatórios ou ativados pela via alternativa (M2).^{10–12}

- Cél. progenitoras de macrófagos/cél. dendríticas (MDP)
- Monócito $\text{Ly6C}^+ \text{CX}_3\text{CR1}^{\text{lo}} \text{CCR2}^+ \text{CD62L}^+$
- Monócito $\text{Ly6C}^{\text{lo}} \text{CX}_3\text{CR1}^{\text{hi}} \text{CCR2}^- \text{CD62L}^-$

MCP-3: Proteína quimiotática de monócitos 3
 CCR2: Receptor 2 de quimiocina CC
 CX₃CR1: Receptor 1 de quimiocina CX₃

FONTE (Adaptado de): Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. Front Immunol. 2015;6.

Figura 8 – Monócitos são produzidos na medula óssea e transportados para corrente sanguínea e tecidos estimulados por citocinas para dar origem aos macrófagos. Na medula óssea, as células tronco hematopoiéticas originam células progenitoras de macrófagos e células dendríticas, que se dividem em dois subtipos de monócitos, os monócitos $\text{Ly6C}^+ \text{CX}_3\text{CR1}^{\text{lo}} \text{CCR2}^+ \text{CD62L}^+$ e os monócitos $\text{Ly6C}^{\text{lo}} \text{CX}_3\text{CR1}^{\text{hi}} \text{CCR2}^- \text{CD62L}^-$. Ambos subtipos são liberados na corrente sanguínea após sinalização das quimiocinas CCR2 e MCP-3. Uma vez dentro dos vasos sanguíneos, monócitos estão aptos a extravasar e chegar aos tecidos pela sinalização das quimiocinas CCR2 e CX₃CR1. Os macrófagos serão gerados com suas próprias características e nomes de acordo com o local de migração.

Os macrófagos M1 produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias mediante patógenos resistentes e exibem propriedades antimicrobianas, porém, estes efeitos também contribuem para destruição tecidual. A ativação clássica dos macrófagos ocorre quando células recebem estímulos como: (1) interferon gama ($\text{INF-}\gamma$), secretado por células Th1, células

T citotóxicas e células natural killer (NK); (2) lipopolissacarídeos (LPS) e componentes da membrana celular de bactérias gram negativas; e (3) fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF).^{7,12,14}

Macrófagos M1 secretam citocinas como as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-12 e IL-18, além do TNF- α . Fenotipicamente, eles expressam altos níveis de moléculas MHC-II, CD68, CD80 e CD86. Recentemente, foi demonstrado que macrófagos M1 estimulam a expressão da proteína intracelular supressora da sinalização de citocina 3 (SOCS3) e ativam a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) gerando espécies reativas de oxigênio, como o óxido nítrico. Sendo assim, sob condições específicas, macrófagos M1 podem exacerbar o processo inflamatório causando danos à saúde. Entretanto, estes macrófagos também possuem a capacidade de fagocitar inúmeros patógenos e provocar a morte de bactérias intracelulares. Durante a ativação clássica dos macrófagos são iniciados mecanismos microbicidas pela síntese de óxido nítrico, restrição de ferro ou nutrientes aos microrganismos e acidificação do fagossoma.^{7,12,14}

Os macrófagos ativados no padrão oposto ao clássico são chamados de macrófagos de ativação alternativa ou M2. Já foi demonstrado que estímulos como fator estimulador de colônia 1 (CSF-1), IL-4, IL-10, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), IL-13, infecção por fungos e helmintos favorecem a polarização de macrófagos M2, deixando a IL-10 em altas concentrações em detrimento de IL-12, que se encontra reduzida. Macrófagos M2 são peças fundamentais na resposta a parasitas, remodelação tecidual, angiogênese e doenças alérgicas. Fenotipicamente, essa população de macrófagos é caracterizada pela expressão de receptores de manose, também chamado de CD206. Estes macrófagos são recrutados a partir da ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR γ) e delta (PPAR δ), IL-4 ou por transdutores de sinais e ativadores de transcrição 6 (STAT6) levando a uma ativação anti-inflamatória (Figura 9).^{7,10,12,14}

Compreender o comportamento e polarização dos macrófagos é um ponto chave para decifrar a fisiopatologia de várias doenças. Evidências recentes na literatura mundial indicam que doenças autoimunes, frequentemente associadas ao processo inflamatório, apresentam predomínio de macrófagos M1. Tal fato também foi constatado em estudos com doença

inflamatória intestinal, esclerose múltipla, artrite reumatoide e diabetes tipo 1. Outras condições associadas a polarização de macrófagos M1 são a obesidade, a aterosclerose, a doença de Alzheimer e doenças infecciosas causadas por patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* e *Listeria monocytogenes*. Já doenças como a asma são caracterizadas pela tendência de polarização de macrófagos M2, o que também foi evidenciado em infecções por helmintos, tumores e mais recentemente em alguns tipos de vasculites.^{7,14,113}

Figura 9 – Diferenciação dos monócitos de acordo com as citocinas estimulantes. Na presença de IFN- γ e produtos bacterianos os monócitos são diferenciados em macrófagos M1. Na presença de CSF-1, IL-4, IL-10 e IL-13, corticosteroides e vitamina D3 os monócitos são diferenciados em macrófagos M2. Os subtipos M1 e M2 diferem-se com relação ao fenótipo e função. Células M1 tem elevado poder antibacteriano, imunoestimulatório e de promover citotoxicidade tumoral. Células M2 tem elevada capacidade de remover detritos, estimular a angiogênese e promover remodelação e reparo tecidual.

3.3 Inflamassoma

As células da imunidade inata possuem receptores codificados em linhagens germinativas responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Os PAMPs incluem ácidos nucleicos, componentes de paredes celulares de fungos e bactérias, proteínas flagelares, dentre outros, enquanto os DAMPs são substâncias endógenas produzidas ou liberadas por células mortas ou danificadas.³¹

Existem duas classes principais de receptores:³¹

a) Receptores do tipo Toll (“Toll Like Receptors”): Constituem uma família de 11 proteínas transmembranas que reconhecem diferencialmente PAMPs através de um domínio extracelular, iniciando uma resposta inflamatória a partir de um domínio intracelular.³¹

b) Receptores NLRs (“Nod Like Receptors”): São proteínas solúveis que se encontram no citoplasma e sinalizam em resposta a patógenos intracelulares. Esses receptores são capazes de reconhecer peptidoglicanos de paredes celulares bacterianas, sinais endógenos de perigo como o acúmulo de cristais de ácido úrico e baixas concentrações de potássio intracelular, dentre outros. Os NLRs são compostos por três domínios distintos: a) o domínio C-terminal constituído de regiões ricas em leucina responsável pelo reconhecimento do ligante (LRRs); b) o domínio central de oligomerização (NACHT), responsável pela oligomerização do receptor após sua ativação; e c) o domínio efetor, que pode conter domínios de pirina (PYD) ou domínios de recrutamento e ativação das caspase (CARD) ou domínios BIR (repetições de proteínas inibidoras da apoptose de baculovírus).³¹

Quando ativados, os NLRs se oligomerizam para formar uma plataforma denominada inflamassoma, constituída por complexos proteicos que controlam a produção de citocinas próinflamatórias como IL-1 β e IL-18, atuando na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases) como uma estrutura essencial para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e no reconhecimento de sinais de perigo a diferentes componentes.^{28,30,31}

Para que ocorra a formação do inflamassoma, os receptores NLRs recrutam a proteína adaptadora intracelular ASC (“apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD”), que contém uma região N-terminal PYD e uma região C-terminal CARD. Esse recrutamento é realizado através de interações homofílicas entre os seus domínios de pirina (PYD). Já a porção C-terminal CARD permite o recrutamento de caspases inflamatórias, especialmente caspase-1, para a plataforma de sinalização através de interações CARD-CARD, concluindo a formação do complexo proteico (Figura 10).³¹

FONTE (Adaptado de): Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 2015;4:296-307.

Figura 10 – Interação entre NLRs, ASC e Caspase 1 levando a formação do complexo proteico denominado inflamassoma.

Os inflamassomas são expressos em diferentes tipos celulares (monócitos, macrófagos, células dendríticas), epitélios (mucosas, endotélios) e tecidos restritos (placenta, cérebro e testículos), atuando na regulação da morte celular conhecida como piroptose e da reparação dos tecidos. A participação do inflamassoma está confirmada na patogênese de várias doenças inflamatórias, cuja atuação é moldada pelo tipo de ativação e influenciada pelo microambiente, criando um perfil patogênico diferente para cada doença. O inflamassoma estabelece um envolvimento estreito com a

inflamação patológica, pela ativação de vias intracelulares de morte por apoptose, piroptose e necrose, sendo um alvo potencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças de base inflamatória.^{30,32,113}

Até o presente momento, seis tipos distintos de inflamassomas já foram descritos, sendo o inflamassoma NLRP3 o mais bem estudado devido sua associação com importantes doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, tais como Alzheimer, diabetes tipo 2, obesidade, arteriosclerose e doenças intestinais. O inflamassoma também tem sido investigado na fisiopatologia de doenças autoimunes, com relatos de alterações de componentes do inflamassoma associados à suscetibilidade, atividade e respostas ao tratamento de várias enfermidades, como artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, vitiligo, psoríase, esclerose múltipla, espondilite anquilosante, doença de Crohn, doença de Addison, entre outras. Diante do exposto, a detecção de marcadores do inflamassoma vem a ser um ponto importante para esclarecer a fisiopatologia de várias desordens autoimunes que permanecem obscuras.^{28,30,33–35,114}

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sob parecer de número 1.904.121 (ANEXO A). O conteúdo deste estudo também foi analisado pelos pacientes ou por seu responsável legal durante consulta ambulatorial, por meio do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO B).

4.2 Desenho do estudo

Estudo descritivo de coorte transversal retrospectiva.

4.3 Casuística

4.3.1 Seleção

Foram selecionados todos os pacientes com diagnóstico confirmado de PANC acompanhados no ambulatório de vasculites cutâneas do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP, no período de janeiro 2003 a dezembro de 2017. O diagnóstico de PANC foi feito por meio de critérios clínicos e histopatológicos, após excluir sinais ou sintomas da variante sistêmica da doença. Todas as biópsias de pele foram previamente revisadas por um médico patologista e apenas os casos com exame anatomopatológico característico de PANC em atividade foram incluídos na amostra.

4.3.2 Critérios de inclusão

- a. Bloco de parafina da biópsia de pele disponível no Laboratório de Dermatopatologia do HC-FMUSP, com boa qualidade técnica e material suficiente para a realização das reações de imuno-histoquímica.

4.3.3 Critérios de exclusão

- a. Exame anatomopatológico realizado em outro serviço hospitalar.
- b. Pacientes com documentação médica (prescrição, relatório) ou embalagem de medicações sugerindo o uso prévio de corticosteroides orais.
- c. Biópsias de pele realizadas após o início do tratamento clínico no HC-FMUSP, independente do medicamento utilizado.

4.3.4 Amostragem

A população foi definida de acordo com os critérios de inclusão e exclusão expostos anteriormente, sendo os indivíduos do grupo PANC selecionados nas consultas ambulatoriais de rotina, totalizando 14 pacientes.

O grupo controle foi formado por voluntários e por pacientes selecionados no ambulatório de cirurgia dermatológica do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP. Foram obtidas amostras de pele sã provenientes dos membros inferiores de nove pacientes.

4.4 Coleta de dados

Os dados epidemiológicos, parâmetros clínicos e resultado dos exames laboratoriais foram coletados a partir da revisão do prontuário dos pacientes. Todas as informações foram arquivadas em protocolos de pesquisa próprios do trabalho. (ANEXO C)

4.5 Procedimentos

Cortes histológicos obtidos a partir dos blocos de parafina dos fragmentos de biópsia de pele foram feitos para a realização das reações de imuno-histoquímica a fim de demonstrar a população de macrófagos M1, macrófagos M2 e marcadores de inflamassoma no infiltrado da parede vascular.

Os macrófagos M1 foram demonstrados pela expressão do marcador STAT1 enquanto os macrófagos M2 foram evidenciados pelos marcadores CD163, CD206 e CMAF. A ativação do inflamassoma foi demonstrada através dos marcadores NALP1, NALP3, caspase 1 e IL-1 β . O painel de anticorpos utilizados está representado no quadro 3.

Quadro 3 – Painel de anticorpos utilizados.

Anticorpo	Código Clone	Marca	Origem	Tipo	Sistema de detecção	Diluição
STAT1	SC135648	Santa Cruz	Camundongo	Monoclonal	Polímero	1:50
CD163	NCL-L-CD163	Novocastra	Camundongo	Monoclonal	Polímero	1:400
CD206	15-2	Genetex	Camundongo	Monoclonal	Polímero	1:200
CMAF	SC7866	Santa Cruz	Coelho	Policlonal	Polímero	1:100
NALP1	ab3683	Abcam	Coelho	Policlonal	Polímero	1:50
NALP3	Ab17167	Abcam	Coelho	Policlonal	Polímero	1:50
Caspase 1	ab1872	Abcam	Coelho	Policlonal	Polímero	1:50
IL-1β	AF-201-NA	RD Systems	Cabra	Policlonal	LSAB	1:10

Foi utilizado o sistema de revelação LSAB+system-HRP, DakoCytomation (Carpinteria, CA, EUA, código K0690) ou Sistema de Polímero (Novolink, Leica) e o cromógeno diaminobenzidina.

Todas as reações foram realizadas com cortes histológicos de controles positivos para os respectivos anticorpos. Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários, que foram substituídos por imunoglobulinas isotípicas nos procedimentos das reações.

4.6 Protocolo de realização de técnica de imuno-histoquímica

Cortes histológicos de 4 micrômetros (μm) de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St Louis, MO/USA, cód A3648) a 2%. Em seguida, os cortes histológicos foram desparafinados em dois banhos de xilol, de 20 e 10 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente. Na sequência, os espécimes foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e lavados em água corrente por 5 minutos.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos, em calor úmido, e banho-maria a 95°C, por 20 minutos em solução Target Retrieval Solution pH 9.0 (cód. S2367, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) ou solução Target Retrieval Solution pH 6.0 (cód. S1699, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), de acordo com padronizações.

As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por 5 minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4.

Em seguida, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestle®) a 10%, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários descritos no quadro 3. Todos os anticorpos foram diluídos em BSA fração V 1% acrescida de azida sódica 0.1% em tampão PBS pH 7.4, “overnight” a 4°C.

Após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em tampão PBS pH7.4 durante 5 minutos cada, procedeu-se a incubação com anticorpo pós-primário (Novolink Max Polymer Detection System, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, ou o anticorpo secundário anti a espécie animal do anticorpo primário do Kit LSAB.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão PBS pH 7.4 por duas vezes, durante 5 minutos cada, e incubadas com o polímero (Novolink Max Polymer Detection System, cód RE7280-K, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK) ou Sistema Estreptavidina Biotina (LSAB-Dako) pronto para uso em câmara úmida, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Logo depois, os sítios de ligação foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3.3-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St Louis, MO/USA, cód. D5637) 0.03% acrescida de 1.2 mL de água oxigenada 3%.

As lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, contracoradas com hematoxilina de Carazzi por 20 segundos para, posteriormente, serem lavadas mais uma vez em água corrente e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

4.7 Análise semiquantitativa dos macrófagos e inflamassoma

A porcentagem de área corada para os anticorpos foi avaliada por análise de imagem com base em limites de cores. Optou-se por usar os percentuais de acordo com as áreas para esses anticorpos porque, em todas as colorações, foram observadas células com extensões citoplasmáticas que poderiam ser ressaltadas pela contagem convencional de células. As medições foram feitas com o software Image Pro Plus versão 4.1 para Windows (netics mídia cibernético, Silver Spring, MD, EUA) em um PC conectado a uma câmera digital (Zeiss, AxioCam MRc, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico (Zeiss, Axiophot, Alemanha).

Para cada anticorpo as células foram contadas em um mínimo de 15 campos selecionados aleatoriamente e alocados ao lado dos vasos acometidos com uma amplificação de 40X. Todas as colorações nas amostras de tecido codificadas foram digitalizadas como imagens codificadas. A análise das imagens foi baseada em limites de cores, evitando assim a subjetividade.

4.8 Análise estatística

O banco de dados foi montado, inicialmente, utilizando-se o software Microsoft® Office Excel 2010. Posteriormente, o banco de dados foi transferido para utilização no software PASW Statistics V18, com o qual foram elaboradas todas as análises subsequentes, descritas a seguir.

Na análise estatística descritiva as variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de média, mediana e desvio padrão (DP), enquanto as variáveis qualitativas foram expressas pelas frequências absoluta (n) e relativa (%). Devido ao tamanho reduzido da amostra e em decorrência das variáveis não apresentarem distribuição normal, optou-se pela aplicação de testes não paramétricos. Para verificar a existência de associação entre gêneros foi utilizado o teste do Qui-Quadrado. Para verificar a existência de diferença de idade e dos percentuais de áreas imunomarcadas entre os grupos PANC e controle foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Recrutamento dos pacientes

Do período de janeiro de 2016 a dezembro de 2018 foram recrutados pacientes e controles do ambulatório de dermatologia do HC-FMUSP. Inicialmente foram selecionados 22 pacientes com diagnóstico inicial de PANC. Após revisão dos exames anatomopatológicos, quatro pacientes foram excluídos por não apresentarem biópsia de pele com achados característicos da doença, três foram excluídos por estarem em uso de corticosteroide oral e um foi excluído por não possuir material de biópsia suficiente para análise imuno-histoquímica, restando 14 pacientes.

5.2 Distribuição por idade e sexo

Dos 14 pacientes do grupo PANC, 11 eram do sexo feminino (78,6%) e três eram do sexo masculino (21,4%). A proporção mulher:homem encontrada foi de 3,67:1. A idade no momento do diagnóstico variou de 15 a 61 anos, com média de 39,36 anos. Nas mulheres do grupo PANC a idade média foi de 39,91 anos e nos homens foi de 37,33 anos. O grupo controle foi composto cinco mulheres e quatro homens, com idade média de 55,4 anos (Tabelas 1 e 2)

Tabela 1 – Idade dos pacientes do grupo PANC e Controle.

	Grupo						P-valor
	PANC N = 14			Controle N = 9			
Variável	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
Idade (anos)	39,36	35,50	14,553	55,44	60,00	13,482	0,007

Teste não paramétrico de *Mann-Whitney U*.

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes de acordo com o sexo.

Variável		Grupo		Total
		PANC	Controle	
Feminino	N	11	5	18
	% Grupo	78,6%	55,6%	69,6%
Masculino	N	3	4	7
	% Grupo	21,4%	44,4%	30,4%
Total	N	14	9	23
	% Grupo	100%	100%	100%

Qui-Quadrado: 1,371 (p = 0,242)

5.3 Tempo de seguimento

O tempo de seguimento ambulatorial variou de 3 a 168 meses, com média de 82,57 meses e desvio padrão de 42,8 meses.

5.4 Comorbidades

Nove pacientes não apresentavam comorbidades associadas ao quadro de PANC, enquanto cinco apresentavam pelo menos uma comorbidade (35,7%). Das doenças associadas foram registrados casos de hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), hipotireoidismo, dislipidemia, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Uma paciente desenvolveu carcinoma ductal mamário 3 anos após o diagnóstico de PANC.

5.5 Manifestações clínicas e distribuição das lesões

As principais alterações cutâneas observadas foram: úlceras, nódulos, livedo, cicatrizes de atrofia branca e púrpuras; todas com frequência igual entre os sexos. O livedo, descrito como racemosa em todos os casos nos quais foi observado, foi classificado como disseminado em três pacientes. As demais alterações cutâneas estavam localizadas apenas nos membros inferiores.

Sintomas gerais como febre, perda de peso e astenia não foram relatados. Em contrapartida, sintomas no local das alterações cutâneas foram relatados por onze pacientes (78,6%), sendo sete com queixa de dor associada à parestesia do tipo dormência e formigamento, e quatro apenas com dor.

Todos os pacientes com parestesia realizaram eletroneuromiografia e em três deles foi constatado o diagnóstico de mononeurite múltipla (42,9%). A incidência total de mononeurite foi de 21,4%. Não foram observados casos de progressão da PANC para a forma sistêmica.

A tabela 3 resume as principais manifestações clínicas e distribuição das lesões nos pacientes com PANC.

Tabela 3 – Manifestações clínicas e distribuição das lesões cutâneas.

Variáveis	Categorias	Nº (%)
Alterações cutâneas	Úlceras	8 (57,1%)
	Nódulos	7 (50,0%)
	Livedo	6 (42,9%)
	Atrofia branca	5 (35,7%)
	Púrpuras	3 (21,4%)
Distribuição das lesões	Membros inferiores	14 (100%)
Sintomas gerais	Sim	0 (0%)
	Não	14 (100%)
Sintomas locais	Nenhum	3 (21,4%)
	Dor	11 (78,6%)
	Parestesia	7 (50,0%)
Mononeurite	Sim	3 (21,4%)
	Não	11 (78,6%)
Progressão para PAN sistêmica	Sim	0 (0,00%)
	Não	14 (100%)

5.6 Exames complementares

Exames gerais (hemograma, testes de função renal e hepática) estavam normais em todos os casos, assim como as dosagens de complemento (C3, C4 e CH50) e eletroforese de proteínas. O ANCA foi testado em todos os casos, sendo o resultado negativo. A dosagem do FAN foi positiva em cinco casos (35,7%), todos com padrão nuclear pontilhado fino. A pesquisa de alterações no sistema de coagulação mostrou alteração de pelo menos um exame em seis casos (42,9%) sendo o aumento da lipoproteína A [Lp(a)] observado em quatro casos (28,6%). Os testes sorológicos para HBV, HCV e HIV foram negativos, enquanto o ASLO foi positivo em apenas um caso. Dez pacientes realizaram o teste intradérmico com PPD (*purified protein derivative*) e quatro deles foram classificados como forte reator (40%).

5.7 Imunofluorescência direta

A imunofluorescência direta foi realizada em nove das biópsias analisadas, sendo positiva em 88,9% dos casos. Foram observados imunocomplexos do tipo IgM (66,7%), C3 (66,7%), IgA (22,2%) e IgG (11,1%).

A tabela 4 resume os principais dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais encontrados na amostra.

Tabela 4 – Resumo dos principais dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com PANC.

Caso Nº	Sexo Idade (anos)	Segui-mento (meses)	Comorbi-dades	Lesões cutâneas	Local	Sintomas	Mono-neurite	Exames	Trombofilias	IFD
1	F/29	168	–	Livedo Nódulos	MI	–	–	FAN 1:320	–	IgM C3
2	F/31	142	–	Nódulos	MI	Dor	–	PPD +	↑ Fibrinogênio	IgM IgA
3	F/56	113	HAS	Livedo, Úlceras	MI, MS, T	Dor Parestesia	Não	–	↑ Lp(a)	Nega-tiva
4	F/58	111	HAS, DM, DPOC, CA de mama	Nódulos Úlceras	MI	Dor	–	–	↑ D-dímero ↑ Lp(a)	IgG C3 IgA
5	M/24	90	–	AB, Livedo, Úlceras, Púrpuras	MI	Dor Parestesia	Não	–	↑ Lp(a) Anti-cardiolipina IgM +	–
6	F/17	88	–	Nódulos, Úlceras	MI	Dor	–	ASLO + PPD +	–	IgM
7	F/31	87	–	AB, Úlceras	MI	–	–	FAN 1:160	↑ Lp(a)	IgM C3
8	F/54	78	–	Livedo, Nódulos	MI, MS, T	Dor Parestesia	Não	FAN 1:640 PPD +	–	–
9	F/52	74	HAS, DM, DLP	AB, Livedo	MI	Dor Parestesia	Sim	–	↑ D-dímero	–
10	M54	54	DLP	AB, Úlceras, Púrpuras	MI	Dor Parestesia	Sim	FAN 1:80	–	–
11	F/21	52	–	AB, Úlceras, Púrpuras	MI	Dor	–	FAN 1:640	–	IgM C3
12	M/34	49	–	Livedo	MI, MS, T	Dor Parestesia	Sim	–	–	–
13	F/53	47	DM, Hipotireoi-dismo	Nódulos	MI	Dor Parestesia	Não	PPD +	–	C3
14	F/37	3	–	Nódulos, Úlceras	MI	–	–	–	–	IgM C3

Legenda: F: Feminino; M: Masculino; AB: Lesões do tipo atrofia branca; MI: Membros inferiores; MS: Membros superiores; T: tronco; Lp(a): Lipoproteína A; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DM: Diabetes mellitus, DLP: Dislipidemia; DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; CA: Câncer; IFD: Imunofluorescência direta.

5.8 Anatomopatológico e imuno-histoquímica

Imagens referentes revisão dos exames anatomopatológicos para seleção da amostra do estudo.

Figura 11 – Exame anatomopatológico: (A) Vaso de médio calibre na junção dermo-hipodérmica com infiltrado inflamatório perivascular (HE, 2mm). (B) No detalhe, artéria médio calibre com parede permeada por infiltrado neutrofílico (HE, 200µm).

Figura 12 – Exame anatomopatológico: Artéria de médio calibre localizada no subcutâneo com infiltrado inflamatório perivascular exuberante e oclusão intraluminal com depósito fibrinóide (HE, 400µm).

Figura 13 – Exame anatomopatológico: Coloração para demonstrar o comprometimento da lâmina elástica interna (WUT, 400µm).

Imagens representativas da análise imuno-histoquímica realizada.

Figura 14 – Imuno-histoquímica anti-CD163: (A) Áreas imunomarcadas em região perivascular (200µm). (B) Detalhe das células imunomarcadas (200µm).

Figura 15 – Imuno-histoquímica anti-CD163: Áreas imunomarcadas em região perivascular (300µm).

Figura 16 – Imuno-histoquímica anti-CD206: Áreas imunomarcadas em região perivascular (300µm).

Figura 17 – Imuno-histoquímica anti-CD206: Detalhe das células imunomarcadas (100µm).

Figura 18 – Imuno-histoquímica anti-CMAF: Detalhe das células imunomarcadas (200µm).

Figura 19 – Imuno-histoquímica anti-CMAF: Áreas imunomarcadas em região perivascular e tecido subcutâneo (300µm).

Figura 20 – Imuno-histoquímica anti-STAT1: Ausência de áreas imunomarcadas em região perivascular (300µm).

Figura 21 – Imuno-histoquímica anti-STAT1: Ausência de marcação (300µm).

Figura 22 – Imuno-histoquímica anti-NALP1: Ausência de áreas imunomarcadas (300µm).

Figura 23 – Imuno-histoquímica anti-NALP3: Ausência de áreas imunomarcadas (300µm).

5.9 Análise da população de macrófagos M1/M2

Na tabela 5 estão descritas as medidas resumo dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar os macrófagos M1 e M2.

Tabela 5 – Medidas resumo dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar macrófagos M1 e M2.

Anticorpo	Grupo						P-valor
	PANC N = 14			Controles N = 9			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
CD163	2,466600	1,925350	2,0418141	1,049644	0,834200	0,7793717	0,020
CD206	1,522679	1,314000	1,2466861	1,916822	2,190000	0,6852293	0,284
CMAF	0,629729	0,546500	0,6960948	0,000000	0,000000	0,0000000	0,000
STAT1	0,012650	0,000000	0,0330935	0,000000	0,000000	0,0000000	0,086

Teste não paramétrico de *Mann-Whitney U*.

Figura 24 – Boxplots dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar macrófagos M1 e M2 nos pacientes do grupo PANC.

Figura 25 – Boxplots dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar os macrófagos M1 e M2. Diferença entre os grupos PANC e controle.

Figura 26 – Diferença da mediana entre os percentuais de área imunomarcada para cada anticorpo entre os pacientes dos grupos PANC e controle.

5.10 Análise dos marcadores do inflamassoma

Na tabela 6 estão descritas as medidas resumo dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar a ativação do inflamassoma.

Tabela 6 – Medidas resumo dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar a ativação do inflamassoma.

Anticorpo	Grupo						P-valor
	PANC N = 14			Controles N = 9			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
NALP1	1,384229	0,000000	3,2865119	0,029200	0,000000	0,0876000	0,075
NALP3	3,873714	0,854700	7,3592522	0,804044	0,818900	0,8527640	0,649
Caspase	0,013450	0,000000	0,0359765	—	—	—	—
IL1β	0,000636	0,000000	0,0023786	—	—	—	—

Teste não paramétrico de *Mann-Whitney U*.

Figura 27 – Boxplots dos percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos utilizados para evidenciar a ativação do inflamassoma. Diferença entre os grupos PANC e controle.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos dos pacientes com PANC encontrados nesse estudo são semelhantes aos descritos em outros trabalhos da literatura mundial. Diferente da forma sistêmica de PAN, que afeta predominantemente homens, a variante cutânea da doença acomete mais frequentemente mulheres, com estudos chegando a mostrar prevalência de até 90% de casos do sexo feminino. A proporção encontrada entre os sexos, de 3,6 mulheres para cada homem acometido, está dentro da variabilidade das proporções descritas em outros trabalhos, cujo menor valor foi de 1,6:1 e o maior valor foi de 13:1. Já em crianças a proporção é igual entre os sexos, podendo ainda haver predomínio do sexo masculino.^{3,54,55,115}

Sabe-se que a PANC pode acometer pessoas de todas as idades, desde crianças até idosos. Em um estudo realizado apenas com pacientes pediátricos com idade inferior a 10 anos, metade dos casos apresentaram sintomas da doença antes dos 5 anos de idade. Os demais estudos, assim como este, não descrevem casos de acometimento nos primeiros anos de vida. O registro da doença em idades mais avançadas também já foi feito, sendo a idade de 81 anos a maior descrita em uma série de 79 anos casos publicada por Daoud et al. No presente estudo, a idade no início dos sintomas variou de 15 a 61 anos, com média de 39,4 anos, resultados estes semelhantes aos relatados por outros autores.^{54,55,83}

A maioria dos pacientes desse estudo já estava em acompanhamento no ambulatório de vasculites cutâneas há mais de 3 anos, exceto uma paciente que estava em seguimento clínico há apenas 3 meses. O tempo de acompanhamento variou de 3 a 168 meses, com média de 80 meses, equivalente ao período de 6 anos e meio aproximadamente. O longo período de seguimento ambulatorial está diretamente relacionado a cronicidade da doença, que pode durar anos e se manifestar com número variável de exacerbações.^{1,86,95,95}

A investigação de outras doenças não detectou comorbidades em 60% dos pacientes, resultado semelhante ao de outros trabalhos. Dentre os 40% que possuíam comorbidades não foi encontrada relação entre estas doenças e a evolução da PANC em nenhum dos casos, com exceção do caso da paciente portadora de carcinoma ductal de mama, no qual os sintomas da PANC só remitiram após o tratamento cirúrgico do câncer. Apesar de existirem relatos de vasculites cutâneas secundárias a neoplasias, não é possível afirmar, no caso dessa paciente, se as doenças estavam associados ou se ocorreram na mesma época ao acaso.^{79,83,116}

A alteração cutânea mais frequentemente descrita nos pacientes do estudo foram as úlceras (57%), seguidas pelos nódulos subcutâneos. De acordo com a literatura, os nódulos são as manifestações dermatológicas mais prevalentes nos pacientes com PANC, podendo estar presentes em 80 a 100% dos casos, um valor superior ao encontrado no presente estudo. Já a prevalência de úlceras na população estudada foi superior à de outros estudos. Essa diferença pode ser justificada pelo fato deste estudo ter sido realizado em um hospital terciário, que recebe pacientes referenciados de outros serviços de atendimento à saúde, o que acaba aumentando o tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Alguns autores acreditam que as lesões nodulares representem um severo processo inflamatório vascular, o qual poderia evoluir com subsequente ulceração. Sendo assim, o diagnóstico mais tardio poderia favorecer a prevalência de úlceras, ao invés de nódulos, tal como observado na amostra estudada.⁸³⁻⁸⁶

De acordo com a literatura mundial, a ocorrência de livedo reticular pode estar presente em 40 a 85% dos pacientes com PANC, podendo ser a primeira manifestação da doença. Nossos achados corroboram com essa estatística. Importante destacar que existe uma divergência de opiniões a respeito do emprego do termo livedo. Enquanto alguns autores adotam a nomenclatura livedo reticular para todos os casos, fisiológicos ou patológicos, outros empregam o termo livedo racemosa para se referir a um padrão de descoloração rendilhado irregular com arcos que não se interligam completamente associado às condições patológicas, reservando o termo livedo reticular para fazer menção a um padrão de descoloração regular com arcos

mais finos e que se interligam completamente observado em condições fisiológicas.^{1,85,92,93,117}

Cicatrizes de atrofia branca foram descritas inicialmente em doentes com vasculopatia livedoide e durante muitos anos esses termos foram tidos como sinônimos. Entretanto, sabe-se hoje que essas lesões podem surgir no contexto de diferentes entidades clínicas, como na insuficiência venosa, na síndrome do anticorpo antifosfolípide e nas vasculites cutâneas, especialmente na PANC.^{87,88} No presente trabalho, cicatrizes de atrofia branca ocorreram em 35% dos casos, um valor superior ao descrito na literatura.⁸⁵

Histologicamente, as lesões de atrofia branca são caracterizadas por vasculopatia hialinizante segmentar dos vasos sanguíneos da derme, com graus variáveis de depósito de fibrina intravascular. Apesar dessas alterações ocorrerem na derme, um estudo que revisou 29 biópsias de pacientes com atrofia branca encontrou seis casos compatíveis com PANC, sendo três deles diagnosticados previamente como vasculopatia livedoide em biópsias superficiais. Dessa forma, a fim de revelar o comprometimento dos vasos de médio calibre, enfatiza-se a necessidade de realizar biópsias seriadas com representação adequada da junção dermo-hipodérmica em todos os pacientes com lesões de atrofia branca.⁸⁸

A manifestação cutânea de menor frequência nesse estudo foram as púrpuras, observadas em três pacientes (21%). A ocorrência de púrpuras em outros trabalhos da literatura é variável, com artigos descrevendo sua ocorrência em menos de 10% dos casos enquanto outros encontraram prevalência de púrpuras em 50% a 70% dos casos.^{1,5,85,86} Outras lesões não observadas na amostra estudada mas descritas em relatos de casos isolados de PANC foram petéquias, necrose cutânea, lesões urticariformes, bolhas e edema.^{2,86,89,118}

O principal local de acometimento de todos os tipos de lesões cutâneas foram os membros inferiores, estando comprometidos em 100% dos casos, o que corrobora os achados da literatura mundial. Acredita-se que a os membros inferiores sejam a principal região do corpo acometida em decorrência de um distúrbio da circulação que ocorre em pacientes com PANC. Tal condição poderia aumentar a permeabilidade local dos capilares levando a formação de

edema, manifestação frequentemente associada a quadros de vasculites cutâneas nos membros inferiores. Embora alguns estudos relatem a ocorrência de nódulos e até úlceras nos membros superiores e tronco, na amostra analisada a única alteração clínica presente nesses locais foi o livedo racemosa.^{5,86}

Nos pacientes com queixas clínicas, a dor foi o sintoma mais frequentemente relatado, estando presente em quase 80% dos casos, em geral no mesmo local das úlceras e nódulos. Sintomas parestésicos como dormência e formigamento no membro acometido pelas lesões cutâneas foram descritos por sete pacientes (50%). Estes casos realizaram o exame de eletroneuromiografia e em três deles foi confirmado o diagnóstico de mononeurite múltipla.

O acometimento do sistema nervoso periférico se manifestando como mononeurite múltipla é comum nos casos de vasculite, como nas vasculites associadas ao grupo ANCA, na PAN sistêmica e PANC. Acredita-se que a neuropatia seja causada principalmente por isquemia do nervo devido à oclusão de *vasa nervorum* secundária ao processo inflamatório desencadeado pela vasculite, resultando em perda de axônios sensitivos e motores.^{119,120}

A incidência geral de mononeurite neste trabalho foi equivalente a 21%, valor semelhante aos relatados na literatura. Entretanto, se levássemos em consideração apenas os pacientes com sintomas parestésicos, o percentual de mononeurite aumentaria para 42%. A maior prevalência de mononeurite registrada na PANC foi de 57%, observada em um estudo retrospectivo com 101 pacientes japoneses, contudo, os autores desse estudo não deixaram claro se o diagnóstico foi feito por eletroneuromiografia ou se foi baseado apenas em critérios clínicos.^{1,5,86}

Outro ponto relevante à discussão é que dentre os três pacientes com mononeurite dois eram do sexo masculino e apenas um era do sexo feminino, o que sugere uma incidência maior de mononeurite em homens com PANC. Entretanto, devido ao reduzido número de doentes incluídos na amostra, outros estudos em diferentes centros clínicos são necessários para confirmar essa associação. Uma série de casos de PANC descreveu haver maior incidência de

mononeurite em pacientes com úlceras, todavia, dos pacientes com mononeurite do presente estudo somente um apresentava úlcera.⁸³

Sintomas gerais como febre, artralgia, mialgia e perda ponderal não foram relatados pelos pacientes da amostra. Esses achados vão de encontro aos da literatura, com trabalhos descrevendo manifestações extracutâneas em até 64% dos casos. Como na maioria dos casos os sintomas da doença haviam iniciado antes da admissão no ambulatório de vasculites da instituição onde o presente estudo foi realizado, acreditamos que os sintomas gerais podem não ter sido adequadamente registrados em prontuário médico e por isso haveria divergência entre os nossos dados e os da literatura.^{1,86}

A maioria dos pacientes foi acompanhada por um período de pelo menos 4 anos e durante o seguimento nenhum dos casos de PANC progrediu para a forma sistêmica. Este achado é semelhante aos de outros estudos disponíveis na literatura e, por isso, atualmente grande parte dos autores concorda com a hipótese de que a PANC seja uma entidade distinta da PAN sistêmica, com diferenças não apenas no acometimento de órgãos internos, mas também quanto ao prognóstico. Apenas um estudo realizado com 20 pacientes documentou dois casos de progressão da forma cutânea para a sistêmica após 18 e 19 anos de seguimento. Entretanto, questiona-se se tais casos não se tratavam de pacientes com PAN sistêmica, cujas primeiras manifestações clínicas foram as lesões cutâneas.^{44,83,85,86}

Tendo isso em mente, recomenda-se que pacientes com PANC sejam acompanhados sempre a longo prazo, em especial os casos com úlceras e recidivas frequentes, além dos casos com alterações laboratoriais marcadas pelo aumento de: FAN, fator reumatoide, PCR, imunoglobulinas, velocidade de hemossedimentação (VHS) e contagem de leucócitos. Alguns autores orientam ainda atenção aos pacientes com manifestações extracutâneas como febre, artrite, mialgia e sinais de neuropatia periférica, sugerindo que esses sintomas possam ser marcadores de progressão para a forma sistêmica.^{1,121}

Embora as alterações laboratoriais mencionadas acima sejam descritas em algumas séries de casos de PANC, elas não foram observadas na amostra estudada, exceto o FAN positivo. Alterações dos níveis de complemento apontados em outros trabalhos também não foi constatado. Já a pesquisa de

anormalidades no sistema de coagulação identificou alterações previamente relatadas na literatura como aumento do D-dímero e do fibrinogênio. Vale destacar o aumento da Lp(a), uma condição que representa fator de risco para o desenvolvimento de trombose por alterar a fibrinólise e provocar distúrbio na inibição da via do fator tecidual, ainda não havia sido relatada em pacientes com PANC. Esses resultados favorecem a hipótese de que duas diferentes condições, trombose e vasculite, possam estar associadas na PANC.^{3,5}

Um resumo comparativo dos dados epidemiológicos e clínicos observados nos principais trabalhos publicados que avaliaram casos de PANC está exposto no quadro 4.

Quadro 4 – Principais dados epidemiológicos e clínicos de pacientes com PANC publicados na literatura e na presente casuística.

Autor Ano Nº de Casos	Ikeda 2020¹²¹ N = 84	Morimoto 2016⁸⁵ N = 21	Morgado 2015⁸⁴ N = 35	Kawakami 2013⁸⁶ N = 101	Furukawa 2012¹ N = 22	Ishiguro 2010⁵ N = 16	Marques 2020 N = 14
Mulheres	70%	81%	80%	70%	86%	87%	78%
F:M	2,3:1	4:1	4:1	2,4:1	6:1	7:1	3,6:1
Idade média (anos)	45	44	45	45	48	36	39
Nódulos	24%	100%	74%	100%	86%	62%	50%
Úlceras	30%	1%	14%	49%	22%	18%	57%
Livedo	61%	62%	74%	84%	45%	43%	43%
Atrofia branca	–	14%	–	–	–	–	36%
Púrpuras	40%	9%	–	67%	45%	25%	21%
MMII comprometidos	85%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Sintomas extracutâneos	37%	24%	31%	67%	64%	66%	0%
Mononeurite	–	–	9%	57%	–	22%	21%
Progressão para PAN sistêmica	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Legenda: F: Feminino; M: Masculino; MMII: Membros inferiores; PAN: poliarterite nodosa.

No que se refere a pesquisa de agentes etiológicos, o presente estudo ratificou a ausência de associação entre PANC e hepatites virais tal qual comprovado na literatura. A clássica associação com infecções estreptocócicas foi observada em um dos casos e confirmada após dosagem do ASLO, o que reforça a importância de se investigar episódios de infecção de vias aéreas superiores previamente ao surgimento dos sintomas da PANC, especialmente na população mais jovem.^{5,30,55} O PPD, testado em 10 pacientes, foi positivo em quatro casos, todos classificados como forte reator (> 20mm), o que chama atenção para a possibilidade de associação entre o *Mycobacterium tuberculosis* e a PANC. Entretanto, o fato do Brasil ser um país endêmico para tuberculose deve ser considerado e por isso outros estudos são necessários para comprovar tal associação.⁷⁵

Apesar de cinco pacientes terem apresentado FAN reagente, todos com padrão nuclear pontilhado fino, nenhum deles preencheu os critérios do Colégio Americano de Reumatologia para o diagnóstico de Lúpus eritematoso sistêmico.¹²² Todos os doentes foram testados para o ANCA, mas nenhum foi positivo. Resultados semelhantes a estes foram observados em outros trabalhos, reforçando o conceito de que a PANC não faz parte das vasculites associadas ao ANCA.^{1,44,83,86,95}

O estudo dos macrófagos tem sido de grande valia para esclarecer a fisiopatologia de várias desordens autoimunes, podendo ser um importante alvo terapêutico no futuro. Os macrófagos podem ser identificados nos tecidos a partir de fatores de transcrição ou por proteínas específicas por eles expressas, como enzimas, proteínas transmembranas, receptores *scavenger* ou citocinas. Apesar de existirem diferentes marcadores de macrófagos M1 e M2, optamos por utilizar os anticorpos STAT1, CD163, CD206 e CMAF por estes serem marcadores já bastante estudados e utilizados em pesquisas da polarização de macrófagos em diversas doenças.^{123,124}

Inicialmente, calculamos as medidas resumo para o percentual de área imunomarcada por cada um dos anticorpos nas biópsias dos pacientes do grupo PANC, já sendo possível observar uma diferença entre os marcadores de macrófagos M2 e o STAT1, marcador de macrófagos M1 (Figura 24). Posteriormente, calculamos a diferença das medianas do percentual de área

imunomarcada por cada um dos anticorpos entre os grupos PANC e controle (Figura 25). Por fim, a análise estatística comprovou existir diferença entre os grupos para os marcadores CD163 e CMAF ($p < 0,05$), o que confirmou o predomínio de macrófagos M2 nos pacientes com PANC.

Por se tratar de uma doença inflamatória autoimune, seria plausível acreditar na participação de macrófagos M1 na fisiopatologia da doença. Contudo, o encontro de macrófagos M2 nas biópsias de pele analisadas vai de encontro a esse raciocínio inicial. Algumas explicações poderiam justificar esses achados, como o fato de muitos pacientes terem utilizado pelo menos um medicamento prescrito por profissionais de outros serviços antes de serem encaminhados ao HC-FMUSP. Durante a primeira consulta, alguns casos não souberam informar com precisão quais drogas haviam recebido, nem especificar o tempo de uso. Nesse contexto, não é possível descartar completamente o uso prévio de corticosteroides orais, o que poderia influenciar a ativação de macrófagos pela via alternativa, por mais que todos os pacientes estivessem com doença em franca atividade no momento da realização da biópsia.

Todavia, alguns autores defendem que o tratamento com corticosteroides, na prática, não influencie a ativação de macrófagos M2. Essa teoria se baseia em um estudo cujo resultado mostrou concentrações semelhantes de células M2 em pacientes com vasculites associadas ao ANCA que estavam em uso de glicocorticoides orais quando comparados aos pacientes que não estavam recebendo nenhum tratamento sistêmico. Na mesma pesquisa, amostras de sangue de controles saudáveis foram estimuladas com IL-10 e três diferentes doses de dexametasona, havendo polarização M2 no grupo que recebeu apenas IL-10 e no grupo que recebeu dexametasona associada a IL-10. A dexametasona sozinha, independente da dose utilizada, não foi capaz de estimular a diferenciação de macrófagos M2.¹⁵

A presença de macrófagos M2 foi relatada previamente em outras doenças inflamatórias autoimunes, assim como em diferentes tipos de vasculites (Quadro 5). Alguns autores acreditam que essas células possam ter implicância prognóstica. Na glomerulonefrite associada à Púrpura de Henoch-Schönlein, o número de macrófagos M2 está diretamente relacionado ao

aumento da creatinina sérica, a estágios mais avançados de insuficiência renal e à formação de crescente, o que também foi observado em pacientes com glomerulonefrite pauci-imune, sugerindo que essas células possam representar um fator de mau prognóstico em vasculites com acometimento renal.^{17,18}

Também já foi suscitada a hipótese de que os macrófagos M2 pudessem exercer influência sobre o intervalo e a frequência das recidivas em vasculites com curso crônico. Para avaliar essa condição, Ohlsson et al compararam a quantidade de células M2 em pacientes com diagnóstico de poliangiite microscópica (PAM) e granulomatose com poliangiite (GPA) durante as fases de atividade e remissão da doença. O resultado desse estudo revelou uma nítida diferença na concentração de macrófagos M2 entre os casos ativos de PAM e os casos em remissão clínica, o que não ocorreu nos pacientes com GPA, que mantiveram a capacidade de induzir a polarização M2 mesmo durante a remissão dos sintomas clínicos. Assim sendo, os autores acreditam haver, de fato, um papel ainda não definido das células M2 nos períodos de recaída em alguns tipos de vasculites.¹⁵

Quadro 5 – Vasculites associadas a macrófagos e seu fenótipo.

Vasculite	Nº de casos	Amostra	Macrófagos	Referência
ACG	20	Biópsia artéria temporal	M1 e M2	Ciccia F et al (2013) ²⁰
GPA	22	Biópsia de pulmão	M2	Park J et al (2014) ¹²⁵
PAM	10	Sangue	M2	Ohlsson SM et al (2014) ¹⁵
GPA	13	Sangue	M2	Ohlsson SM et al (2014) ¹⁵
GPA	35	Biópsia de vias aéreas	M2	de Souza AWS et al (2017) ¹⁶
GEPA	1	Biópsia de pele	M2	Nakashima C et al (2017) ¹²⁶
Henoch-Schönlein	49	Biópsia de Rim	M2	Kim J et al (2019) ¹⁸
Doença de Kawasaki	5	Biópsia artéria coronária	M1	Ohashi R et al (2019) ¹⁹

Legenda: ACG: Arterite de células gigantes; GPA: Granulomatose com poliangiite (Wegener); PAM: Poliangiite microscópica; GEPA: Granulomatose eosinofílica com poliangiite (Churg-Strauss).

Uma das limitações do presente estudo está relacionada à sua natureza transversal, sendo factível avaliar a polarização dos macrófagos apenas no momento do diagnóstico de PANC. A avaliação longitudinal das biópsias de pele dos pacientes antes do início do tratamento e após a remissão poderia esclarecer melhor o papel das células M2 na evolução da doença. Outro ponto a considerar é que, devido à dificuldade de obtenção de biópsias normais de pele de pacientes previamente hígidos, não foi possível formar um grupo controle pareado por sexo com o grupo PANC.

Para avaliar a ativação do inflamassoma no processo fisiopatológico da PANC, optamos por utilizar os marcadores NALP1 e NALP3 devido a já conhecida associação desses dois tipos de inflamassoma com importantes doenças metabólicas e inflamatórias crônicas. Como a ativação da caspase-1 e o consequente estímulo da interleucina-1 beta (IL-1b) são importantes elementos marcadores da ativação desse complexo multiprotéico, seus níveis também foram avaliados.^{30,34,114}

Após a conclusão das reações imuno-histoquímicas nas biópsias dos pacientes do grupo PANC, não foram identificadas áreas imunomarcadas pelos anticorpos caspase-1 e IL-1b e, por esse motivo, tais marcadores não foram testados no grupo controle. Um pequeno percentual de área foi imunomarcada pelos anticorpos NALP1 e NALP3 (Figura 27), contudo, não houve diferença estatística quando comparado ao grupo controle. Assim sendo, não foi possível constatar a participação do inflamassoma na amostra analisada.

Apesar dos testes estatísticos terem considerado os percentuais de área imunomarcada pelos anticorpos NALP1 e NALP3 iguais entre os grupos, na figura 28 podemos observar que o percentual de marcação foi ligeiramente superior no grupo PANC. Esse resultado pode ser reflexo do tamanho reduzido da amostra avaliada e dessa forma, novos estudos são necessários para excluir indubitavelmente a participação do inflamassoma na PANC.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou dados demográficos e clínicos de PANC compatíveis com trabalhos publicados em diferentes países. Apesar do número reduzido de casos, o que se espera em um estudo monocêntrico e pela rara prevalência da doença, a frequência de doentes com PPD reator forte o aumento nas concentrações da lipoproteína A sérica são dados sobre alterações de exames complementares associados à PANC que foram acrescidos à literatura.

Até o presente momento não há relatos de estudos com a finalidade de avaliar a polarização dos macrófagos em pacientes com PANC, sendo a constatação da presença de macrófagos M2 na doença um fato inédito na literatura mundial. Tal resultado sugere uma provável influência da imunidade inata na fisiopatologia de uma enfermidade que se acreditava estar associada basicamente à deposição de imunocomplexos na parede de artérias de médio calibre, quer como adjuvantes ao dano vascular ou como reparadores teciduais. O reconhecimento de uma possível participação de macrófagos de fenótipo M2 na inflamação vascular característica da PANC representa um novo campo de pesquisa para elucidar diversas questões que permanecem pendentes sobre a real etiopatogenia da doença, podendo ainda gerar potenciais alvos terapêuticos no futuro. O estudo de proteínas do inflamassoma não demonstrou expressão na doença.

8 ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das populações de macrófagos de fenótipo M1/M2 e marcadores de ativação do inflamassoma em pacientes com poliarterite nodosa cutânea

Pesquisador: PAULO RICARDO CRIADO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60767116.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.904.121

Apresentação do Projeto:

Adequado.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar as populações de macrófagos de fenótipo M1/M2 e marcadores de ativação do inflamassoma em um grupo de vinte pacientes com diagnóstico de poliarterite nodosa cutânea (PANC) acompanhados no Ambulatório de Vasculites da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, afim de caracterizar a participação da autoimunidade e da imunidade inata nesta vasculite.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos de uma coleta de sangue. Benefícios: não há benefícios diretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 1.904.121

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_722163.pdf	05/01/2017 20:24:01		Aceito
Outros	Anuencia_Laboratorio_de_Imunohistoquimica.jpg	05/01/2017 20:22:56	PAULO RICARDO CRIADO	Aceito
Outros	Anuencia_Laboratorio_de_Histologia.jpg	05/01/2017 20:22:21	PAULO RICARDO CRIADO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado.docx	05/01/2017 20:18:58	PAULO RICARDO CRIADO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_revisado.docx	05/01/2017 20:18:34	PAULO RICARDO CRIADO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	21/09/2016 18:08:41	PAULO RICARDO CRIADO	Aceito
Outros	Cadastro_online_15110.pdf	25/08/2016 15:27:08	PAULO RICARDO CRIADO	Aceito
Outros	Incor.pdf	25/08/2016 15:25:37	PAULO RICARDO CRIADO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 1.904.121

SAO PAULO, 01 de Fevereiro de 2017

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Título da pesquisa: Avaliação das populações de macrófagos de fenótipo M1/M2 e marcadores de ativação do inflamassoma em pacientes com poliarterite nodosa cutânea.

Pesquisador principal: Gabriela Franco Marques, CRM-SP 147.459

Convidamos o (a) Sr (a) para participar desta pesquisa que tem como finalidade estudar as populações de macrófagos de fenótipo M1/M2 e marcadores de ativação do inflamassoma em pacientes com poliarterite nodosa cutânea acompanhados no Ambulatório de Vasculites da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Esse estudo é de suma importância para compreender como ocorre o surgimento da doença, e esses dados poderão ser utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos, o que irá auxiliar o tratamento de pacientes acometidos por essa enfermidade.

Inicialmente será feito um levantamento de dados epidemiológicos (idade, sexo, cor, estado civil, profissão), clínicos (tipos de lesões de pele e sintomas associados) e laboratoriais (exames de sangue) dos pacientes diagnosticados com poliarterite nodosa cutânea, acompanhados no ambulatório de vasculites cutâneas, que concordarem em participar deste estudo. Essas informações serão coletadas diretamente do prontuário dos pacientes de acordo com as anotações feitas pelos médicos durante as consultas ambulatoriais. Posteriormente serão analisados os resultados das biópsias de pele já realizadas nos pacientes durante o acompanhamento ambulatorial, e serão feitos exames neste material que está armazenado nas dependências do laboratório de patologia do Hospital das Clínicas. Nenhuma nova biópsia de pele será coletada.

Todas as informações serão arquivadas em protocolos de pesquisa próprios do trabalho.

Como benefício, os pacientes poderão ter novas informações a respeito da sua doença e poderão colaborar com o desenvolvimento de novos medicamentos.

É necessário que os pacientes ou de seus responsáveis legais compreendam e concordem com todos os itens aqui estipulados para que os dados contidos no seu prontuário possam ser, então, utilizados nesta pesquisa.

Os dados obtidos serão utilizados somente para a presente pesquisa, não havendo divulgação de qualquer informação que possa levar a identificação dos pacientes.

Os protocolos de pesquisa serão devidamente arquivados e armazenados por cinco anos em local seguro com os autores, sendo o acesso restrito à equipe envolvida neste projeto. Posteriormente, estes documentos serão incinerados.

É garantida aos pacientes, a liberdade de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Em caso de quais danos pessoais, diretamente provocados pelos procedimentos propostos pelo pesquisador, os participantes terão direito a total apoio para tratamento médico e psicológico na instituição.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá nenhum pagamento por sua participação. Os pacientes terão direito de se manter informados a respeito dos resultados parciais da pesquisa, esclarecimentos e dúvidas. Para isto, a qualquer momento do estudo os pacientes, seus responsáveis e ou familiares terão acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a médica dermatologista Gabriela Franco Marques, CRM-SP 147.459, que pode ser encontrada no prédio de ambulatórios do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pelo período da tarde de 5ª feira no setor de dermatologia, no ambulatório de vasculites cutâneas. Poderá ainda ser feito contato com a pesquisador principal por telefone: (11) 94831-3333; ou por email: gabriela_franco_@hotmail.com. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-6442 ramis 16, 17 e 18, ou (11) 2661-7585; email: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

DECLARAÇÃO

Declaro que compreendi as informações do que li ou que me foram explicadas sobre o trabalho em questão.

Discuti com a Dra. Gabriela Franco Marques sobre minha decisão em participar nesse estudo, ficando claros para mim, quais são os propósitos da pesquisa, os procedimentos a ser realizados, os possíveis desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro, também, que minha participação não será paga, nem terei despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário, inclusive se optar por desistir de participar da pesquisa.

Concordo voluntariamente em participar desse estudo podendo retirar meu consentimento a qualquer momento, sem necessidade de justificar o motivo da desistência, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

São Paulo, _____, de _____ de 2016.

Assinatura da paciente ou de seu representante legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido desta paciente ou representante legal para participação no presente estudo.

Dra. Gabriela Franco Marques
Pesquisador responsável

ANEXO C – Protocolo De Pesquisa

Dados epidemiológicos

- 1) Nome do Paciente: _____
- 2) RG HC: _____
- 3) Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino
- 4) Idade: _____

Dados clínicos

- 1) Início do seguimento: _____
- 2) Tempo de seguimento: _____
- 3) Comorbidades: _____
- 4) Manifestações dermatológicas:
 - ☐ Livedo racemosa
 - ☐ Úlceras
 - ☐ Nódulos subcutâneos
 - ☐ Lesões de atrofia branca
 - ☐ Púrpura
 - ☐ Outros: _____
- 5) Localização das lesões:
 - ☐ MMII
 - ☐ MMSS
 - ☐ Tronco
- 6) Sintomas associados:
 - ☐ Dor
 - ☐ Sintomas parestésicos
 - ☐ Outros: _____

Exames complementares:

- 1) Hemograma: _____
- 2) Função renal: _____
- 3) Função hepática: _____
- 4) Complemento: _____

- 5) FAN: _____
- 6) ANCA: _____
- 7) Eletroforese de proteínas: _____
- 8) D-dímero: _____
- 9) Lipoproteína A: _____
- 10) Pesquisa de trombofilias: _____
- 11) PPD: _____
- 12) Urina 1: _____
- 13) Doppler de artérias renais: _____
- 14) Exame anatomopatológico: _____

- 15) Imunofluorescência: _____

- 16) Imuno-histoquímica:
 - STAT1: _____
 - CD163: _____
 - CD206: _____
 - CMAF: _____
 - NALP1: _____
 - NALP3: _____
 - IL-1 β : _____
 - Caspase 1: _____

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Furukawa F. Cutaneous polyarteritis nodosa: an update. *Ann Vasc Dis.* 2012;5(3):282-288. doi:10.3400/avd.ra.12.00061
2. Morgan AJ, Schwartz RA. Cutaneous polyarteritis nodosa: a comprehensive review. *Int J Dermatol.* 2010;49(7):750-756. doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04522.x
3. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y. High titer of anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum.* 2007;57(8):1507-1513. doi:10.1002/art.23081
4. Diaz-Perez JL, Schroeter AL, Winkelmann RK. Cutaneous Periarthritis Nodosa: Immunofluorescence Studies. *Arch Dermatol.* 1980;116(1):56-58. doi:10.1001/archderm.1980.01640250058016
5. Ishiguro N, Kawashima M. Cutaneous polyarteritis nodosa: a report of 16 cases with clinical and histopathological analysis and a review of the published work. *J Dermatol.* 2010;37(1):85-93. doi:10.1111/j.1346-8138.2009.00752.x
6. Shirai T, Hilhorst M, Harrison DG, Goronzy JJ, Weyand CM. Macrophages in Vascular Inflammation – From Atherosclerosis to Vasculitis. *Autoimmunity.* 2015;48(3):139-151. doi:10.3109/08916934.2015.1027815
7. Parisi L, Gini E, Baci D, et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res.* 2018;2018:8917804. doi:10.1155/2018/8917804
8. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 2016;44(3):450-462. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.015
9. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:643-675. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112220
10. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* January 2018. doi:10.1002/jcp.26429
11. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology.* February 2018. doi:10.1111/imm.12910
12. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol.* 2014;5:614. doi:10.3389/fimmu.2014.00614
13. Zhou D, Huang C, Lin Z, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014;26(2):192-197. doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.004
14. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(6):463-488.

15. Ohlsson SM, Linge CP, Gullstrand B, et al. Serum from patients with systemic vasculitis induces alternatively activated macrophage M2c polarization. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2014;152(1-2):10-19. doi:10.1016/j.clim.2014.02.016
16. de Souza AWS, van Timmeren M, Sanders J-S, et al. M2 macrophage is the predominant phenotype in airways inflammatory lesions in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):100. doi:10.1186/s13075-017-1310-4
17. Zhao L, David MZ, Hyjek E, Chang A, Meehan SM. M2 macrophage infiltrates in the early stages of ANCA-associated pauci-immune necrotizing GN. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2015;10(1):54-62. doi:10.2215/CJN.03230314
18. Kim J, Choi S-E, Lee KH, Jeong HJ, Shin JI, Lim BJ. Tubulointerstitial Infiltration of M2 Macrophages in Henoch-Schönlein Purpura Nephritis Indicates the Presence of Glomerular Crescents and Bad Clinical Parameters. *BioMed Res Int.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/8579619
19. Ohashi R, Fukazawa R, Shimizu A, et al. M1 macrophage is the predominant phenotype in coronary artery lesions following Kawasaki disease. *Vasc Med Lond Engl.* 2019;24(6):484-492. doi:10.1177/1358863X19878495
20. Ciccica F, Alessandro R, Rizzo A, et al. IL-33 is overexpressed in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(2):258-264. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201309
21. Gonzalez Santiago TM, Zavialov A, Saarela J, et al. Dermatologic Features of ADA2 Deficiency in Cutaneous Polyarteritis Nodosa. *JAMA Dermatol.* 2015;151(11):1230-1234. doi:10.1001/jamadermatol.2015.1635
22. Navon Elkan P, Pierce SB, Segel R, et al. Mutant adenosine deaminase 2 in a polyarteritis nodosa vasculopathy. *N Engl J Med.* 2014;370(10):921-931. doi:10.1056/NEJMoa1307362
23. Zhou Q, Yang D, Ombrello AK, et al. Early-onset stroke and vasculopathy associated with mutations in ADA2. *N Engl J Med.* 2014;370(10):911-920. doi:10.1056/NEJMoa1307361
24. Sunderkötter CH, Zelger B, Chen K-R, et al. Nomenclature of Cutaneous Vasculitis: Dermatologic Addendum to the 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2018;70(2):171-184. doi:10.1002/art.40375
25. Caorsi R, Penco F, Schena F, Gattorno M. Monogenic polyarteritis: the lesson of ADA2 deficiency. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2016;14(1). doi:10.1186/s12969-016-0111-7
26. Human A, Pagnoux C. Diagnosis and management of ADA2 deficient polyarteritis nodosa. *Int J Rheum Dis.* 2019;22 Suppl 1:69-77. doi:10.1111/1756-185X.13283
27. Meyts I, Aksentijevich I. Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (DADA2): Updates on the Phenotype, Genetics, Pathogenesis, and Treatment. *J Clin Immunol.* 2018;38(5):569-578. doi:10.1007/s10875-018-0525-8
28. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* February 2018. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.011

29. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21(7):677-687. doi:10.1038/nm.3893
30. Yang C-A, Chiang B-L. Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015;61:1-8. doi:10.1016/j.jaut.2015.05.001
31. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*. 2015;4:296-307. doi:10.1016/j.redox.2015.01.008
32. Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev*. 2015;265(1):35-52. doi:10.1111/imr.12286
33. Jiang D, Chen S, Sun R, Zhang X, Wang D. The NLRP3 inflammasome: Role in metabolic disorders and regulation by metabolic pathways. *Cancer Lett*. 2018;419:8-19. doi:10.1016/j.canlet.2018.01.034
34. Sidiropoulos PI, Goulielmos G, Voloudakis GK, Petraki E, Boumpas DT. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(10):1382-1389. doi:10.1136/ard.2007.078014
35. Vakrakou AG, Boiu S, Ziakas PD, Xingi E, Boleti H, Manoussakis MN. Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren's syndrome fueled by inflammagenic DNA accumulations. *J Autoimmun*. March 2018. doi:10.1016/j.jaut.2018.02.010
36. Fang H, Shao S, Cao T, et al. Increased expression of NLRP3 inflammasome components and interleukin-18 in patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 2016;83(2):116-123. doi:10.1016/j.jdermsci.2016.04.009
37. Kim EH, Park M-J, Park S, Lee E-S. Increased expression of the NLRP3 inflammasome components in patients with Behçet's disease. *J Inflamm Lond Engl*. 2015;12. doi:10.1186/s12950-015-0086-z
38. Martínez-Godínez MA, Cruz-Domínguez MP, Jara LJ, et al. Expression of NLRP3 inflammasome, cytokines and vascular mediators in the skin of systemic sclerosis patients. *Isr Med Assoc J IMAJ*. 2015;17(1):5-10.
39. Okazaki T, Shinagawa S, Mikage H. Vasculitis syndrome—diagnosis and therapy. *J Gen Fam Med*. 2017;18(2):72-78. doi:10.1002/jgf2.4
40. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al. Nomenclature of Systemic Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 1994;37(2):187-192. doi:10.1002/art.1780370206
41. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013;65(1):1-11. doi:10.1002/art.37715
42. Watts RA. Evolving concepts in classification of systemic vasculitis: where are we and what is the way forward? *Int J Rheum Dis*. April 2018. doi:10.1111/1756-185X.13304
43. Jennette JC. Overview of the 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Clin Exp Nephrol*. 2013;17(5):603-606. doi:10.1007/s10157-013-0869-6

44. Criado PR, Marques GF, Morita TCAB, de Carvalho JF. Epidemiological, clinical and laboratory profiles of cutaneous polyarteritis nodosa patients: Report of 22 cases and literature review. *Autoimmun Rev.* 2016;15(6):558-563. doi:10.1016/j.autrev.2016.02.010
45. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Guerrero J, Rodriguez-Ledo P, Llorca J. The epidemiology of the primary systemic vasculitides in northwest Spain: implications of the Chapel Hill Consensus Conference definitions. *Arthritis Rheum.* 2003;49(3):388-393. doi:10.1002/art.11115
46. Mahr A, Guillevin L, Poissonnet M, Aymé S. Prevalences of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener's granulomatosis, and Churg-Strauss syndrome in a French urban multiethnic population in 2000: A capture–recapture estimate. *Arthritis Care Res.* 2004;51(1):92-99. doi:10.1002/art.20077
47. Mohammad AJ, Jacobsson LTH, Mahr AD, Sturfelt G, Segelmark M. Prevalence of Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, polyarteritis nodosa and Churg–Strauss syndrome within a defined population in southern Sweden. *Rheumatology.* 2007;46(8):1329-1337. doi:10.1093/rheumatology/kem107
48. Jese R, Rotar Z, Praprotnik S, Hocevar A, Tomsic M. AB0581 The Estimated Annual Incidence Rate of Polyarteritis Nodosa in Slovenia. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(Suppl 2):998-998. doi:10.1136/annrheumdis-2014-eular.2564
49. Selga D, Mohammad A, Sturfelt G, Segelmark M. Polyarteritis nodosa when applying the Chapel Hill nomenclature—a descriptive study on ten patients. *Rheumatology.* 2006;45(10):1276-1281. doi:10.1093/rheumatology/kel091
50. Watts RA, Lane SE, Bentham G, Scott DG. Epidemiology of systemic vasculitis: a ten-year study in the United Kingdom. *Arthritis Rheum.* 2000;43(2):414-419. doi:10.1002/1529-0131(200002)43:2<414::AID-ANR23>3.0.CO;2-0
51. Kanecki K, Nitsch-Osuch A, Gorynski P, Wierzba W, Tarka P, Tyszko P. Polyarteritis nodosa: decreasing incidence in Poland. *Arch Med Sci AMS.* 2019;15(5):1308-1312. doi:10.5114/aoms.2017.68407
52. Mao Y, Yin L, Xia H, et al. Incidence and clinical features of paediatric vasculitis in Eastern China: 14-year retrospective study, 1999-2013. *J Int Med Res.* 2016;44(3):710-717. doi:10.1177/0300060515621446
53. Neshar G, Ben-Chetrit E, Mazal B, Breuer GS. The Incidence of Primary Systemic Vasculitis in Jerusalem: A 20-year Hospital-based Retrospective Study. *J Rheumatol.* 2016;43(6):1072-1077. doi:10.3899/jrheum.150557
54. Ishibashi M, Chen K-R. A morphological study of evolution of cutaneous polyarteritis nodosa. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(4):319-326. doi:10.1097/DAD.0b013e3181766190
55. Kumar L, Thapa BR, Sarkar B, Walia BN. Benign cutaneous polyarteritis nodosa in children below 10 years of age--a clinical experience. *Ann Rheum Dis.* 1995;54(2):134-136.
56. Kawakami T, Ishizu A, Arimura Y, Soma Y. Serum anti-lysosomal-associated membrane protein-2 antibody levels in cutaneous polyarteritis nodosa. *Acta Derm Venereol.* 2013;93(1):70-73. doi:10.2340/00015555-1418

57. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood*. 2010;116(12):2011-2018. doi:10.1182/blood-2010-01-261669
58. Caorsi R, Penco F, Grossi A, et al. ADA2 deficiency (DADA2) as an unrecognised cause of early onset polyarteritis nodosa and stroke: a multicentre national study. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(10):1648-1656. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210802
59. Liu M-L, Williams KJ, Werth VP. Microvesicles in Autoimmune Diseases. *Adv Clin Chem*. 2016;77:125-175. doi:10.1016/bs.acc.2016.06.005
60. Matsumoto A, Al-Rohil RN, Bravin M, Anderson L, Wroblewski D, Carlson JA. Cutaneous polyarteritis nodosa localized to a region of lymphedema secondary to *Streptococcus viridans* cellulitis and multiple surgeries. *J Cutan Pathol*. 2017;44(2):210-216. doi:10.1111/cup.12861
61. Ramos F, Figueira R, Fonseca JE, et al. [Juvenile cutaneous polyarteritis nodosa associated with streptococcal infection]. *Acta Reumatol Port*. 2006;31(1):83-88.
62. Takeishi M, Mimori A, Adachi D, Suzuki T. [A case of adult polyarteritis nodosa associated with fulminant group A streptococcal infection]. *Ryumachi Rheum*. 2002;42(4):682-686.
63. David J, Ansell BM, Woo P. Polyarteritis nodosa associated with streptococcus. *Arch Dis Child*. 1993;69(6):685-688.
64. Stein RH, Phelps RG, Sapadin AN. Cutaneous polyarteritis nodosa after streptococcal necrotizing fasciitis. *Mt Sinai J Med N Y*. 2001;68(4-5):336-338.
65. Whittaker SJ, Dover JS, Greaves MW. Cutaneous polyarteritis nodosa associated with hepatitis B surface antigen. *J Am Acad Dermatol*. 1986;15(5 Pt 2):1142-1145.
66. Zoshima T, Matsumura M, Suzuki Y, et al. A case of refractory cutaneous polyarteritis nodosa in a patient with hepatitis B carrier status successfully treated with tumor necrosis factor alpha blockade. *Mod Rheumatol*. 2013;23(5):1029-1033. doi:10.1007/s10165-012-0732-8
67. Akhter A, Said A. Cutaneous manifestations of viral hepatitis. *Curr Infect Dis Rep*. 2015;17(2):452. doi:10.1007/s11908-014-0452-7
68. Minkowitz G, Smoller BR, McNutt NS. Benign cutaneous polyarteritis nodosa. Relationship to systemic polyarteritis nodosa and to hepatitis B infection. *Arch Dermatol*. 1991;127(10):1520-1523.
69. Bourgeais A-M, Dore M-X, Croue A, Leclech C, Verret J-L. [Cutaneous polyarteritis nodosa following hepatitis B vaccination]. *Ann Dermatol Venereol*. 2003;130(2 Pt 1):205-207.
70. Ventura F, Antunes H, Brito C, Pardal F, Pereira T, Vieira AP. Cutaneous polyarteritis nodosa in a child following hepatitis B vaccination. *Eur J Dermatol EJD*. 2009;19(4):400-401. doi:10.1684/ejd.2009.0695
71. Díez-Picazo LD, Yebra M, Mellor S, Suárez E. [Hepatitis C and cutaneous polyarteritis nodosa]. *Med Clin (Barc)*. 2002;118(7):278.
72. Soufir N, Descamps V, Crickx B, et al. Hepatitis C virus infection in cutaneous polyarteritis nodosa: a retrospective study of 16 cases. *Arch Dermatol*. 1999;135(8):1001-1002.

73. Peraire J, Vidal F, Mayayo E, Torre L, Richart C. Cutaneous polyarteritis nodosa in human immunodeficiency virus infection. *Br J Rheumatol*. 1993;32(10):937-938.
74. Durst R, Goldschmidt N, Ben Yehuda A. Parvovirus B19 infection associated with myelosuppression and cutaneous polyarteritis nodosa. *Rheumatol Oxf Engl*. 2002;41(10):1210-1212.
75. Imanishi H, Tsuruta D, Oshimo T, et al. Cutaneous polyarteritis nodosa induced by Mycobacterium tuberculosis. *J Dermatol*. 2012;39(8):738-739. doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01398.x
76. El Sayed F, Dhaybi R, Ammourey A, Chababi M, Bazex J. Myasthenia gravis with cutaneous polyarteritis nodosa. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(2):215-217. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.02015.x
77. Magnant J, Lhommet C, Machet L, Machet M-C, Guilmet J-L, Diot E. [Cutaneous polyarteritis nodosa and Crohn's disease: An association not to be ignored]. *Rev Med Interne*. 2009;30(4):345-348. doi:10.1016/j.revmed.2008.10.335
78. Lee WJ, Kim CH, Chang SE, et al. A case of cutaneous polyarteritis nodosa in autoimmune hepatitis. *Acta Derm Venereol*. 2009;89(4):442-443. doi:10.2340/00015555-0659
79. Fain O, Hamidou M, Cacoub P, et al. Vasculitides associated with malignancies: analysis of sixty patients. *Arthritis Rheum*. 2007;57(8):1473-1480. doi:10.1002/art.23085
80. Lightman HI, Valderrama E, Ilowite NT. Cutaneous polyarteritis nodosa and thromboses of the superior and inferior venae cavae. *J Rheumatol*. 1988;15(1):113-116.
81. Tehrani R, Nash-Goelitz A, Adams E, Dahiya M, Eilers D. Minocycline-induced cutaneous polyarteritis nodosa. *J Clin Rheumatol Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis*. 2007;13(3):146-149. doi:10.1097/RHU.0b013e3180690693
82. Pelletier F, Puzeat E, Blanc D, Faivre B, Humbert P, Aubin F. Minocycline-induced cutaneous polyarteritis nodosa with antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Eur J Dermatol EJD*. 2003;13(4):396-398.
83. Daoud MS, Hutton KP, Gibson LE. Cutaneous periarteritis nodosa: a clinicopathological study of 79 cases. *Br J Dermatol*. 1997;136(5):706-713.
84. Buffiere-Morgado A, Battistella M, Vignon-Pennamen M-D, et al. Relationship between cutaneous polyarteritis nodosa (cPAN) and macular lymphocytic arteritis (MLA): Blinded histologic assessment of 35 cPAN cases. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(6):1013-1020. doi:10.1016/j.jaad.2015.09.010
85. Morimoto A, Chen K-R. Reappraisal of histopathology of cutaneous polyarteritis nodosa. *J Cutan Pathol*. 2016;43(12):1131-1138. doi:10.1111/cup.12809
86. Kawakami T, Okudaira A, Okano T, et al. Treatment for cutaneous arteritis patients with mononeuritis multiplex and elevated C-reactive protein. *J Dermatol*. 2013;40(12):955-961. doi:10.1111/1346-8138.12303
87. Alavi A, Hafner J, Dutz JP, et al. Atrophie blanche: is it associated with venous disease or livedoid vasculopathy? *Adv Skin Wound Care*. 2014;27(11):518-524; quiz 525-526. doi:10.1097/01.ASW.0000455098.98684.95

88. Mimouni D, Ng PP, Rencic A, Nikolskaia OV, Bernstein BD, Nousari HC. Cutaneous polyarteritis nodosa in patients presenting with atrophie blanche. *Br J Dermatol*. 2003;148(4):789-794.
89. Tounkara TM, Jachiet M, Frumholtz L, et al. Blue toe syndrome in cutaneous polyarteritis nodosa. *Rheumatol Oxf Engl*. 2018;57(7):1281. doi:10.1093/rheumatology/key061
90. Mahmood-Rao H, Ding T, Gandhi N. Gangrenous digital infarcts in a severe case of cutaneous polyarteritis nodosa. *BMJ Case Rep*. 2017;2017. doi:10.1136/bcr-2017-220300
91. In SI, Han JH, Kang HY, Lee E-S, Kim YC. The histopathological characteristics of livedo reticularis. *J Cutan Pathol*. 2009;36(12):1275-1278. doi:10.1111/j.1600-0560.2009.01282.x
92. Criado PR, Faillace C, Magalhaes LS, Brito K, Carvalho JF de. Livedo reticular: classificação, causas e diagnósticos diferenciais. *Acta Reumatol Port*. 2012;37(3):218-225.
93. Gibbs MB, English JC, Zirwas MJ. Livedo reticularis: an update. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(6):1009-1019. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.051
94. Herbert CR, Russo GG. Polyarteritis nodosa and cutaneous polyarteritis nodosa. *Skinmed*. 2003;2(5):277-283; quiz 284-285. doi:10.1111/j.1540-9740.2003.02214.x
95. Nakamura T, Kanazawa N, Ikeda T, et al. Cutaneous polyarteritis nodosa: revisiting its definition and diagnostic criteria. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(1):117-121. doi:10.1007/s00403-008-0898-2
96. Kato A, Hamada T, Miyake T, et al. Clinical and Laboratory Markers Associated With Relapse in Cutaneous Polyarteritis Nodosa. *JAMA Dermatol*. 2018;154(8):922-926. doi:10.1001/jamadermatol.2018.1601
97. Tomasson G, Monach PA, Merkel PA. Thromboembolic disease in vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(1):41-46. doi:10.1097/BOR.0b013e32831de4e7
98. Hall LD, Dalton SR, Fillman EP, Dohse L, Elston DM. Re-examination of features to distinguish polyarteritis nodosa from superficial thrombophlebitis. *Am J Dermatopathol*. 2013;35(4):463-471. doi:10.1097/DAD.0b013e3182770a42
99. Rogalski C, Sticherling M. Panarteritis cutanea benigna--an entity limited to the skin or cutaneous presentation of a systemic necrotizing vasculitis? Report of seven cases and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2007;46(8):817-821. doi:10.1111/j.1365-4632.2007.02975.x
100. Ross K, Contreras J, Aung-Din D, Lien M. Asymptomatic cutaneous polyarteritis nodosa: treatment options and therapeutic guidelines. *Cutis*. 2017;100(2):125-128.
101. Haviv R, Capua M, Amir J, Harel L. Cutaneous polyarteritis nodosa successfully treated with topical diflucortolone valerate: a case report & review of the literature. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2014;12:46. doi:10.1186/1546-0096-12-46
102. Kawakami T, Okano T, Takeuchi S, Kimura S, Soma Y. Complete resolution of refractory cutaneous arteritis by intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Int J Dermatol*. 2015;54(8):e323-325. doi:10.1111/ijd.12863

103. Marie I, Miranda S, Girszyn N, Soubrane J-C, Vandhuick T, Levesque H. Intravenous immunoglobulins as treatment of severe cutaneous polyarteritis nodosa. *Intern Med J.* 2012;42(4):459-462. doi:10.1111/j.1445-5994.2012.02739.x
104. Breda L, Franchini S, Marzetti V, Chiarelli F. Intravenous immunoglobulins for cutaneous polyarteritis nodosa resistant to conventional treatment. *Scand J Rheumatol.* 2016;45(2):169-170. doi:10.3109/03009742.2015.1092582
105. Inoue N, Shimizu M, Mizuta M, Ikawa Y, Yachie A. Refractory cutaneous polyarteritis nodosa: Successful treatment with etanercept. *Pediatr Int Off J Jpn Pediatr Soc.* 2017;59(6):751-752. doi:10.1111/ped.13283
106. Krishnan S, Bhakuni DS, Kartik S. Rituximab in refractory cutaneous polyarteritis. *Int J Rheum Dis.* 2012;15(5):e127. doi:10.1111/j.1756-185X.2012.01733.x
107. Saunier A, Issa N, Vandenhende M-A, Morlat P, Doutre M-S, Bonnet F. Treatment of polyarteritis nodosa with tocilizumab: a new therapeutic approach? *RMD Open.* 2017;3(1):e000446. doi:10.1136/rmdopen-2017-000446
108. Kluger N, Guillot B, Bessis D. Ulcerative cutaneous polyarteritis nodosa treated with mycophenolate mofetil and pentoxifylline. *J Dermatol Treat.* 2011;22(3):175-177. doi:10.3109/09546631003636809
109. Yamamoto T, Inoue Y, Tomiita M, et al. Successful treatment of Group A β -hemolytic Streptococcus infection-associated juvenile cutaneous polyarteritis nodosa with tonsillectomy. *Mod Rheumatol.* 2015;25(6):967-969. doi:10.3109/14397595.2013.844388
110. Kawakami T, Soma Y. Use of warfarin therapy at a target international normalized ratio of 3.0 for cutaneous polyarteritis nodosa. *J Am Acad Dermatol.* 2010;63(4):602-606. doi:10.1016/j.jaad.2009.10.033
111. Kawakami T, Soma Y. Therapeutic effect of clopidogrel on cutaneous polyarteritis nodosa. *Arch Dermatol.* 2010;146(1):100-101. doi:10.1001/archdermatol.2009.349
112. Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front Immunol.* 2015;6. doi:10.3389/fimmu.2015.00263
113. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6). doi:10.3390/ijms19061801
114. Carlström M, Ekman A-K, Petersson S, Söderkvist P, Enerbäck C. Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. *Exp Dermatol.* 2012;21(12):932-937. doi:10.1111/exd.12049
115. Erden A, Batu ED, Sönmez HE, et al. Comparing polyarteritis nodosa in children and adults: a single center study. *Int J Rheum Dis.* 2017;20(8):1016-1022. doi:10.1111/1756-185X.13120
116. Solans-Laqué R, Bosch-Gil JA, Pérez-Bocanegra C, Selva-O'Callaghan A, Simeón-Aznar CP, Vilardell-Tarres M. Paraneoplastic vasculitis in patients with solid tumors: report of 15 cases. *J Rheumatol.* 2008;35(2):294-304.

117. Pincelli MS, Echavarria AMJ, Criado PR, et al. Livedo Racemosa: Clinical, Laboratory, and Histopathological Findings in 33 Patients. *Int J Low Extrem Wounds*. January 2020;1534734619896938. doi:10.1177/1534734619896938
118. Alibaz-Oner F, Koster MJ, Crowson CS, et al. Clinical Spectrum of Medium-Sized Vessel Vasculitis. *Arthritis Care Res*. 2017;69(6):884-891. doi:10.1002/acr.23007
119. Imboden JB. Involvement of the Peripheral Nervous System in Polyarteritis Nodosa and Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies-Associated Vasculitis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2017;43(4):633-639. doi:10.1016/j.rdc.2017.06.011
120. Bougea A, Anagnostou E, Spandideas N, Triantafyllou N, Kararizou E. An update of neurological manifestations of vasculitides and connective tissue diseases: a literature review. *Einstein Sao Paulo Braz*. 2015;13(4):627-635. doi:10.1590/S1679-45082015RW3308
121. Ikeda T, Kawakami T, Arimura Y, et al. Survey of Japanese dermatological vasculitis specialists on cases of cutaneous arteritis (cutaneous polyarteritis nodosa). *J Dermatol*. February 2020. doi:10.1111/1346-8138.15273
122. Yu C, Gershwin ME, Chang C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review. *J Autoimmun*. 2014;48-49:10-13. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.004
123. Bhattacharya S, Aggarwal A. M2 macrophages and their role in rheumatic diseases. *Rheumatol Int*. 2019;39(5):769-780. doi:10.1007/s00296-018-4120-3
124. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PloS One*. 2013;8(11):e80908. doi:10.1371/journal.pone.0080908
125. Park J, Lee EB, Song YW. Decreased tumour necrosis factor- α production by monocytes of granulomatosis with polyangiitis. *Scand J Rheumatol*. 2014;43(5):403-408. doi:10.3109/03009742.2014.894568
126. Nakashima C, Otsuka A, Kitayama N, Honda T, Kabashima K. Basophil and M2 macrophage infiltration in lesional skin of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *Eur J Dermatol EJD*. 2017;27(5):552-553. doi:10.1684/ejd.2017.3094