DANIELLE PRISCILLA GOMES E SOUZA ESPINEL

**Análise dos níveis séricos e expressão tecidual
cutânea da lipoproteína(a) em doentes com
vasculopatia livedoide**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

(Versão corrigida conforme resolução CoPGr6018/11)

**SÃO PAULO
2017**

“Eu sempre acreditei que para vencer é preciso lutar, sofrer, suportar e nunca desanimar.

Fiz da dermatologia uma razão para a minha vida”.

Sebastião de Almeida Prado Sampaio

À Deus, pelas inúmeras bênçãos recebidas em toda minha vida, pela força quando achei que não conseguiria, pela saúde e disposição para continuar lutando pelos meus objetivos.

Ao meu filho, Pedro Espinel Fialkoski, que nasceu em meio a esse projeto, me tornando uma pessoa melhor, me ensinando o verdadeiro sentido de viver, de amar e de se doar.

Ao meu marido e grande parceiro, Rodrigo Espinel Fialkoski, pelo seu grande apoio e incentivo nos momentos mais difíceis, nas intermináveis noites e fim de semanas de trabalho, cuidando do nosso filho com tanto amor e carinho.

Ao meu avô, Luís Galdino, que juntamente com minha avó Nely Noronha e seus oito filhos, na década de 1960 tomaram a decisão de sair do sertão do Rio Grande do Norte rumo a capital, Natal, e mudaram a trajetória da nossa família, sem eles nada disso seria possível.

Aos meus pais, Noronha e Malu, que apesar das dificuldades, nunca mediram esforços para me apoiar nos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Ana Patrícia, Carlos Eduardo e Victor Hugo, apesar das diferenças, sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Sophia, Paulo Victor, João Guilherme, Lara Helena e Luis Victor, por me ensinarem diariamente como é bom amar.

Aos meus sogros, Marta e Celso, que como pais, me acolheram com tanto amor, torceram e me incentivaram em todos os momentos de dificuldade.

A minha cunhada Vanessa, mais uma irmã que a vida me deu, sempre me apoiando em todos momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao querido orientador, amigo e eterno professor Dr. Paulo Ricardo Criado, pela presença constante, pelo incentivo e pela confiança depositada em mim.

À grande amiga, Thais Helena Bello Di Giacomo, grande idealizadora desse projeto e de tantos outros dos quais fiz parte, sempre me incentivando e apoiando.

À querida professora Dra. Miriam Nacagami Sotto, que acreditou nesse projeto desde o princípio.

À querida professora Dra. Valéria Aoki e ao Professor Dr. Walter Belda, pela valiosa contribuição na banca de qualificação dessa tese.

À bióloga Naiura Vieira Pereira, que dedicou tantas horas de trabalho no preparo das lâminas.

Ao Professor Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pelo grande apoio no preparo e leitura das lâminas.

Ao serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo apoio e incentivo à realização desse projeto.

A todos os profissionais, que de alguma forma ajudaram na coleta de dados, na seleção dos pacientes e na análise estatística.

Aos pacientes, que são a razão de tanto estudo e dedicação, tornando possível a realização desse trabalho.

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. Serviço 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 Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Quadro Clínico	3
1.2	Epidemiologia.....	7
1.3	Etiopatogenia	7
1.4	Achados Histopatológicos	13
1.5	Diagnóstico	18
1.6	Tratamento.....	21
1.6.1	Medicamentos que atuam na dor nociceptiva e neuropática	23
1.6.2	Drogas estimuladoras da atividade fibrinolítica endógena.....	24
1.6.3	Drogas inibidoras da agregação plaquetária	26
1.6.4	Drogas vasodilatadoras.....	27
1.6.5	Drogas hemorreológicas	27
1.6.6	Moduladoras da resposta linfocitária	28
1.6.7	Terapias de mecanismos ainda pouco esclarecidos	28
1.6.8	Drogas anticoagulantes.....	31
1.7	Endotélio na vasculopatia livedoide.....	37
1.8	Lipoproteína(a).....	41
1.8.1	Regulação da síntese.....	42
1.8.2	Processo de degradação	45
1.8.3	Modificações oxidativas	46
1.8.4	Papel fisiológico e patológico da Lp(a)	47
2	OBJETIVOS.....	52
2.1	Objetivo Principal	53
2.2	Objetivo Secundário	53
3	MÉTODOS	54
3.1	Casuística	55
3.2	Métodos	58
3.2.1	Técnica de imuno-histoquímica.....	63
3.3	Análise Estatística	66
4	RESULTADOS	68
4.1	Recrutamento dos Pacientes.....	69
4.2	Caracterização da Amostra	70

4.3	Morfometria	73
4.3.1	Análise da Lp(a) tecidual através de imunohistoquímica com anticorpo anti-Lp(a)	73
4.3.2	Análise dos níveis séricos de Lp(a) nos casos e controles	76
5	DISCUSSÃO	78
5.1	Lipoprotéina(a) e Expressão Tecidual	79
5.2	Lipoprotéina(a) Sanguínea	81
5.3	Lipoprotéina(a) x Vasculopatia Livedoide	82
5.3.1	Alterações imunológicas	82
5.3.2	Distúrbios da fibrinólise	83
5.3.3	Disfunção endotelial	84
5.3.4	Resposta terapêutica	85
5.4	Limitações	86
6	CONCLUSÕES	87
7	ANEXOS	89
8	REFERÊNCIAS	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	- Ácido acetil-salicílico
ABM	- Atrofia branca de Milian
ACL	- Anticoagulante lúpico
ALT	- Alanina aminotransferase
ANCA	- Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos
Apo (a)	- Apolipoproteína(a)
AST	- Aspartato aminotransferase
ATA	- Atmosferas absolutas
CAPPesq	- Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEs	- Células endoteliais
DE	- Disfunção endotelial
dRVVT	- Teste do veneno da víbora de Russel
FAN	- Fator antinuclear
FT	- Fator Tecidual
FXR	- Receptor farnesoide X (<i>Farnesoid X receptor</i>)
GGT	- Gamaglutamil transferase
HBPM	- Heparina de baixo peso molecular
HC-FMUSP	- Hospital da Clínicas da Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo
HE	- Hematoxilina e eosina
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HNF	- Heparina não-fracionada
IGIV	- Imunoglobulina intravenosa
IgM	- Imunoglobulina M
IL-1	- Interleucina 1
IL-2	- Interleucina 2
IL-6	- Interleucina-6
InCor	- Instituto do Coração
INR	- <i>International Normalized Ratio</i>

LBS	- Sítios de ligação a lisina (<i>lysine bindings sites</i>)
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LES	- Lupus eritematoso sistêmico
LIM17	- Laboratório de Investigação Médica
Lp(a)	- Lipoproteína(a)
Lp(a)ox	- Lipoproteína(a) oxidada
MEC	- Matriz extracelular
MTHFR	- Enzima metilenotetrahidrofolato redutase
NO	- Óxido nítrico
O ₂	- Oxigênio
OTH	- Oxigenioterapia hiperbárica
PAI-1	- Inibidor do ativador do plasminogênio tecidual tipo 1
PAN cutânea	- Poliarterite nodosa cutânea
PAS	- Ácido periódico de Schiff
PBS	- Solução salina tamponada
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PGI ₂	- Prostaglandina I ₂
PURPLE	- <i>Painful purpuric ulcers with reticular pattern of the lower extremities</i>
PUVA	- Fototerapia com Ultra-violeta A
rt-PA	- Fator ativador do plasminogênio tecidual recombinante
SAF	- Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide
SC	- Via subcutânea
TEV	- Tromboembolismo venoso
TFPI	- Inibidor da via do fator tecidual
TGF-β	- Fator de crescimento tecidual beta
t-PA	- Ativador do plasminogênio tecidual (<i>Tissue plasminogen activator</i>)
TTPA	- Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
VFM	- Vasodilatação fluxo-mediada
VL	- Vasculopatia livedoide
VLDL	- <i>Very low density lipoprotein</i>
VR	- Valor de referência

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vasculopatia livedoide - Quadro clínico	4
Figura 2 - Vasculopatia livedoide - Quadro clínico	4
Figura 3 - Vasculopatia livedoide e livedo racemoso.....	5
Figura 4 - Oclusão da <i>vasa nervorum</i> na vasculopatia livedoide.....	6
Figura 5 - Sumário da cascata de coagulação, sistema de anticoagulação e fibrinólise	12
Figura 6 - Sistema fibrinolítico.....	13
Figura 7 - Histopatologia da vasculopatia livedoide	14
Figura 8 - Estrutura da Lipoproteína(a)	41
Figura 9 - Similaridade entre Apo(a) e plasminogênio.....	43
Figura 10 - Síntese de todas as ações da lipoproteína(a)	48
Figura 11 - Ações protrombótica e proaterosclerótica da lipoproteína(a)	50
Figura 12 - Evidências de associação da lipoproteína(a) com a vasculopatia livedoide.....	51
Figura 13 - Fluxograma de recrutamento de pacientes e controles.....	70
Figura 14 - Imunohistoquímica de pacientes com vasculopatia livedoide	73
Figura 15 - Imunohistoquímica de pacientes com vasculopatia livedoide	73
Figura 16 - Imunohistoquímica em pele controle.....	74
Figura 17 - Imunohistoquímica de pacientes e controles	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Etiopatogenia da vasculopatia livedoide	8
Quadro 2 - Trombofilias associadas à vasculopatia livedoide	10
Quadro 3 - Abordagem diagnóstica da vasculopatia livedoide	20
Quadro 4 - Escore de gravidade da vasculopatia livedoide.....	21
Quadro 5 - Opções terapêuticas para vasculopatia livedoide	22
Quadro 6 - Terapia anticoagulante para vasculopatia livedoide	35
Quadro 7 - Lipoproteína(a)	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas de pacientes e controles	71
Tabela 2 - Achados laboratoriais nos pacientes com vasculopatia livedoide	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico box-plot de Lp(a) tecidual para grupos e gêneros.....	75
Gráfico 2 - O gráfico Box-plot de Lp(a) sanguínea para grupos e gêneros.....	76
Gráfico 3 - Correlação entre Lp(a) tecidual e sanguínea	77

RESUMO

Espinel DPGS. Análise dos níveis séricos e expressão tecidual cutânea da lipoproteína(a) em doentes com vasculopatia livedoide [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017

Introdução: a vasculopatia livedoide é uma doença cutânea rara que acomete principalmente mulheres adultas, cursando inicialmente com lesões purpúricas e necróticas intensamente dolorosas, acometendo extremidades inferiores, que podem evoluir com úlceras de tamanhos variados. Estas lesões costumam evoluir com cicatrizes atróficas, estreladas e com telangiectasias, denominadas cicatrizes de atrofia branca. Apesar da etiologia não estar totalmente esclarecida, os distúrbios da coagulação parecem ser o mecanismo fisiopatológico primário da vasculopatia livedoide. Inúmeras trombofilias já foram associadas à vasculopatia livedoide, porém cerca de metade dos casos permanece sem etiologia definida. Recentemente foi documentado aumento de lipoproteína(a) na vasculopatia livedoide. Níveis plasmáticos elevados de lipoproteína(a) são considerados um fator de risco causal independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e trombóticas, devido à sua similaridade estrutural com o plasminogênio. A deposição tecidual da lipoproteína(a) em vasos ateroscleróticos é bem descrita, porém na vasculopatia livedoide a participação da lipoproteína(a) não é conhecida. **Objetivos:** analisar os níveis séricos da lipoproteína(a) e a sua expressão tecidual na pele dos pacientes com vasculopatia livedoide e comparar os resultados com um grupo controle. **Métodos:** amostras de pele obtidas através de biópsia de pele de 38 pacientes com vasculopatia livedoide (27 do sexo feminino e 11 do sexo masculino) e 9 indivíduos do grupo controle (5 do sexo feminino e 4 do sexo masculino) foram avaliados para a presença de lipoproteína(a) através de imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal anti-

lipoproteína(a). Os níveis plasmáticos da lipoproteína(a) foram analisados por imunoturbidimetria e comparados com setenta pacientes portadores de outras doenças dermatológicas. **Resultados:** utilizando anticorpo policlonal contra lipoproteína(a), observou-se que a pele perilesional em pacientes com vasculopatia livedoide apresentava dez vezes mais lipoproteína (a) do que a pele controle. O coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,02$) mostrou que os níveis teciduais de lipoproteína(a) não se correlacionaram com os níveis plasmáticos nos pacientes com vasculopatia livedoide. Níveis plasmáticos elevados de lipoproteína(a) foram observados nos portadores de vasculopatia livedoide, no entanto não pode ser demonstrada diferença estatística em relação ao grupo controle. **Conclusões:** achados de aumento da expressão tecidual de lipoproteína(a) na pele lesionada e níveis plasmáticos elevados desta proteína em pacientes com vasculopatia livedoide podem corroborar com a hipótese de que a lipoproteína(a) possa contribuir para a patogênese da vasculopatia livedoide através dos seus efeitos antifibrinolíticos, pró- trombóticos e ação direta no endotélio vascular, induzindo a formação do trombo.

Descritores: Dermatopatia vascular. Lipoproteína(a). Úlcera cutânea. Trombose. Trombofilia.

ABSTRACT

Espinel DPGS. *Analysis of serum levels and cutaneous expression of lipoprotein(a) in 38 patients with livedoid vasculopathy* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017

Background: livedoid vasculopathy is a chronic disorder that usually presents as recurrent reticulated purpura on the lower limbs, with recurrent painful, purpuric and/or necrotic macules that may lead to ulcerative lesions. These lesions usually heal into atrophic white scars, with depigmentation and telangiectasias, known as "*atrophie blanche*". Although the etiology of the livedoid vasculopathy is not fully understood, coagulation disorders appear to be the primary pathophysiological mechanism. Hereditary thrombophilia has been associated with livedoid vasculopathy, but about half of the cases remain without defined etiology. Recently, high serum levels of lipoprotein(a) in livedoid vasculopathy patients have been documented. Elevated plasma levels of lipoprotein(a) are an independent risk factor for the development of cardiovascular and thrombotic diseases due to their structural similarity with plasminogen. Lipoprotein(a) deposition in atherosclerotic vessels is well described, but its role in livedoid vasculopathy is unknown.

Objectives: To analyze the serum levels of lipoprotein(a) and tissue expression in the skin of patients with livedoid vasculopathy and to compare the results with a control group. **Methods:** Skin biopsy samples from 38 patients (27 women-11 men) with active lesions diagnosed with livedoid vasculopathy and 9 samples of normal skin (5 women-4 men) from control individuals without livedoid vasculopathy were evaluated for skin expression of lipoprotein(a) by immunohistochemistry using polyclonal anti-lipoprotein(a) antibody. Plasma levels of lipoprotein(a) were analyzed by immunoturbidimetry and compared with seventy patients with other dermatological diseases. **Results:** We found lesional skin in patients with livedoid vasculopathy expressed tenfold higher lipoprotein(a) immunostaining than controls. High plasma levels of lipoprotein(a) were observed in livedoid vasculopathy patients, but we cannot observed a positive correlation ($p = 0.02$) between skin expression of Lipoprotein(a) and plasma levels of Lipoprotein(a) in patients with livedoid

vasculopathy. **Conclusions:** Increased of lipoprotein(a) tissue expression on lesioned skin and elevated plasma levels of this protein in patients with livedoid vasculopathy may corroborate the hypothesis that lipoprotein(a) may contribute to the pathogenesis of livedoid vasculopathy through its antifibrinolytic effects, prothrombotic and direct action on the vascular endothelium, inducing thrombosis.

Descriptors: Skin diseases, vascular. Lipoprotein(a). Cutaneous ulcer. Thrombosis. Thrombophilias.

1 INTRODUÇÃO

A vasculopatia livedoide (VL) foi descrita em 1967 por Bard e Winkelmann, constituindo uma dermatose crônica e recorrente, cujo manejo pode ser desafiador. Esta afecção tem vasta sinonímia: livedo vasculite¹ vasculite hialinizante segmentar^{2,3}, vasculite livedoide^{2,3}, livedo reticular com úlceras de verão³, livedo reticular com úlceras de inverno⁴, atrofia branca de Milian (ABM)^{3,4} e *painful purpuric ulcers with reticular pattern of the lower extremities* (PURPLE)³.

A VL se apresenta como lesões eritemato-purpúricas puntiformes acometendo membros inferiores e pés, acompanhadas de máculas necróticas e dolorosas as quais frequentemente, evoluem com úlceras que lentamente culminam com a formação de cicatrizes atróficas, nacaradas e estreladas ou reticuladas com telangiectasias, também conhecidas como atrofia branca (*Atrophie Blanche*)². Comumente associa-se à hiperpigmentação na sua fase resolutive. Atualmente é considerada como uma vasculopatia oclusiva dos vasos dérmicos de etiologia não completamente esclarecida. As doenças mais comumente associadas à VL são as trombofilias (hereditárias ou adquiridas) e doenças auto-imunes. No entanto, metade dos casos permanece como idiopático². Recentes publicações relacionaram a VL a elevados níveis séricos da lipoproteína(a) [Lp(a)], proteína considerada como um importante fator de risco para

doenças cardiovasculares e trombóticas⁵. O tratamento da VL ainda é um grande desafio estando baseado, principalmente, no uso de medicamentos que atuam no sistema circulatório e no sistema de coagulação e fibrinólise².

1.1 Quadro Clínico

Na VL as lesões cutâneas se iniciam como máculas e/ou pápulas purpúreas, puntiformes ou lenticulares, dolorosas, nos membros inferiores, especialmente nos tornozelos e dorso dos pés, que em seguida geralmente sofrem ulceração, por vezes com múltiplas lesões (Figuras 1 e 2). Estas individualmente medem em torno de 4 a 6 mm de diâmetro, podendo, porém confluir em grandes úlceras de forma geográfica, as quais cicatrizam lentamente, em torno de três a quatro meses⁶. As cicatrizes classicamente possuem bordas "estreladas", cor marfínica, centro atrófico e com múltiplas telangiectasias assumindo o aspecto morfológico de "Atrofia Branca" (*atrophie blanche*) (Figura 1 e 2)⁷. Posteriormente, surgem telangiectasias puntiformes, pigmentação acastanhada de aspecto similar a uma trama reticulada (livedoide) e acompanhadas, por vezes, de verdadeiro livedo racemoso³ (Figura 3). A doença, habitualmente, instala-se bilateralmente nas pernas, provocando frequentemente edema no terço inferior dos membros⁶. A VL demonstra curso crônico, com exacerbações periódicas e recorrentes. O exame físico pode revelar lesões em diferentes estágios evolutivos⁶.

Figura 1 - Vasculopatia livedoide - Quadro clínico. (a) lesões purpúricas com necrose puntiforme e uma pequena úlcera. Algumas cicatrizes brancas atróficas com telangiestasias (atrofia branca) e hiperpigmentação pós-inflamatória. (b) lesão ulcerada com fundo preenchido por fibrina e cicatrizes de atrofia branca ao redor. (c) inúmeras cicatrizes de atrofia branca com hiperpigmentação periférica. (d) múltiplas úlceras atingido grande parte dos membros inferiores com necrose central, acompanhadas de cicatrizes de atrofia branca na porção distal dos membros inferiores

Figura 2 - Vasculopatia livedoide - Quadro clínico. (a) lesões ulceradas acometendo dorso dos pés, acompanhada de cicatrizes de atrofia branca e edema de membros inferiores. (b) múltiplas lesões purpúricas com necrose puntiforme acometendo extensamente os membros inferiores. Observa-se ainda hiperpigmentação e cicatrizes de atrofia branca

Figura 3 - Vasculopatia livedoide e livedo racemoso. Máculas eritemato-violáceas formando tramas irregulares nos membros inferiores de um paciente portador de VL

As cicatrizes pouco retráteis, inflexíveis, podem originar uma fibroesclerose verdadeira, determinando rigidez na pele afetada⁶. Estas cicatrizes (atrofia branca) não são patognomônicas da VL, uma vez que podem ocorrer em outras condições como a estase venosa ou em algumas doenças auto-imunes do tecido conectivo (lúpus eritematoso e dermatomiosite)⁷.

O livedo racemoso (definido pela presença de trama reticulada interrompida) é frequentemente, associado a VL. Geralmente, ocupa os membros inferiores, podendo em alguns pacientes acometer os membros superiores. A dor é uma característica constante nos doentes que experimentam episódios de exacerbação da doença e costuma ser intensa, devido ao seu caráter isquêmico, comprometendo as atividades laborais e levando à significativa diminuição da qualidade de vida⁸. Alguns pacientes

apresentam quadro de hipoestésias ou hiperestésias, caracterizado como mononeurite múltipla⁹. Possivelmente o envolvimento do sistema nervoso periférico ocorre devido a áreas de isquemia multifocal decorrentes da deposição de fibrina e trombina nos *vasa nervorum*⁷ (Figura 4).

A presença de veias varicosas nos doentes com VL varia entre 20% a 75%⁶.

Figura 4 - Oclusão da *vasa nervorum* na vasculopatia livedoide. Deposição de fibrina e semi-occlusão do lúmen da *vasa nervorum* de um doente com mononeurite múltipla nos membros inferiores. Fragmento de pele corado com Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento de 200x)

1.2 Epidemiologia

A prevalência estimada da VL na população geral norte-americana é em torno de um caso para 100.000 habitantes por ano¹⁰, acometendo especialmente a faixa etária entre 15 e 50 anos de idade (média 32 anos) e o sexo feminino em proporção de 2,4 a três mulheres para cada homem¹¹⁻¹³.

1.3 Etiopatogenia

A VL originariamente foi descrita como expressão clínica de uma vasculite no entanto, na atualidade, o principal mecanismo fisiopatogênico considerado é um fenômeno vaso-oclusivo em decorrência de trombose intraluminal das vênulas da derme^{2,7}. Papi *et al.*³ fundamentaram este conceito com base na evolução clínica da doença, sua melhora sob terapia fibrinolítica e antiplaquetária e na detecção de níveis elevados do fibrinopeptídeo A.

Atualmente a maioria dos autores que estuda essa doença considera a VL como doença trombo-oclusiva cutânea, ou seja, doença multigênica e multifatorial^{2,10,13}. A resposta favorável a anticoagulantes, antiplaquetários e fibrinolíticos reforça o mecanismo trombogênico na patogênese da VL^{2,10}. No entanto, até o presente momento a etiopatogênese não está completamente estabelecida, de forma que muitos casos permanecem idiopáticos^{10,14}. As condições mais frequentemente associadas à VL são distúrbios relacionados aos estados de hipercoagulabilidade (trombofilias) e doenças auto-imunes (Quadro 1).

Quadro 1 - Etiopatogenia da vasculopatia livedoide. Associações etiopatogênicas na vasculopatia livedoide

DOENÇAS ASSOCIADAS
Doença Venosa Crônica
Doença Autoimune do Tecido Conectivo   • Lúpus eritematoso sistêmico   • Esclerodermia   • Artrite Reumatoide   • Doença Mista do Tecido Conectivo
Trombofilias Hereditárias   • Mutação do Fator V (Leiden)   • Mutação do gene da Protrombina   • Mutação no promotor do inibidor tipo 1 do ativador do plasminogênio tecidual   • Mutação da Metilenotetraihrofolato redutase (MTHFR)   • Deficiência de Antitrombina   • Deficiência da Proteína C   • Deficiência da Proteína S   • Elevação da Lipoproteína(a)
Trombofilias Adquiridas   • Síndrome e/ou anticorpos antifosfolípide   • Crioglobulinas   • Crioibrinohenemia
Neoplasias Hematológicas
Neoplasias de Órgãos Sólidos
Idiopática

De maneira geral, os três principais fatores que predisõem a trombose, conhecidos como a *tríade de Virchow* são: lesão endotelial, alterações do fluxo sanguíneo e alterações sanguíneas levando à hipercoagulabilidade¹⁵.

Doenças que geram *lesão endotelial* e já relacionadas como causa de VL são: hiperhomocisteinemia¹⁶⁻¹⁸ e doenças auto-imunes como lupus eritematoso sistêmico (LES), esclerodermia, doença mista do tecido conectivo¹⁹ e artrite reumatoide²⁰. As *alterações do fluxo sanguíneo* incluem não só insuficiência venosa²¹, mas também doenças que levam à síndrome da hiperviscosidade, como leucemia mieloide crônica, crioglobulinemia, além da doença de cadeia pesada²².

Os *estados de hipercoagulabilidade* são atualmente classificados como hereditários ou adquiridos. Incluem os defeitos genéticos da cascata da coagulação, distúrbios da agregação plaquetária e do sistema fibrinolítico (Figuras 5 e 6)²². São exemplos de trombofilias hereditárias as deficiências dos anticoagulantes naturais (antitrombina-III, proteína C, proteína S e proteína Z), mutação da protrombina, mutação do fator V (Leiden), hiperhomocisteinemia [decorrente de mutação da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)] e alterações dos níveis plasmáticos de fatores da coagulação (VIII, IX e XI)²². Alguns estados de hipercoagulabilidade que podem ser classificados como adquiridos são: síndrome do anticorpo antifosfolípide, uso de anticoncepcionais orais, reposição hormonal, gravidez, pós-operatório, tabagismo, crioglobulinemia, crio-fibrinogenemia, neoplasias sólidas e hematológicas²².

Entre outros mecanismos relacionados com a trombose, a Lp(a) tem chamado a atenção dos pesquisadores pela sua diversidade de ações, pró-trombótica, pró-aterogênica e antifibrinolítica, sendo considerada pela maioria dos autores como um fator de risco genético e independente para doenças cardiovasculares e fenômenos trombóticos²³.

Entre as diversas associações relatadas entre a VL e estados de hipercoagulabilidade registram-se a deficiência da proteína C^{10,11}, mutação do fator V de Leiden^{10,11,24,25}, mutação do gene da protrombina^{26,27}, hiperhomocisteinemia^{17,18}, deficiência de antitrombina^{10,28,29}, aumento nos níveis da lipoproteína(a)^{5,30,31} e anticorpos antifosfolípidos^{2,10,11} (Quadro 2).

Quadro 2 - Trombofilias associadas à vasculopatia livedoide. Estudos de VL associada a distúrbios de coagulação retirados do PubMed

Autor	Ano	Nº de casos	Trombofilia detectada
Criado <i>et al.</i>³²	2015	4	Lipoproteína (a)
Vasconcelos <i>et al.</i>³⁰	2011	1	Lipoproteína (a)
Goerge <i>et al.</i>⁵	2010	1	Lipoproteína (a)
Tabata <i>et al.</i>³³	2010	1	IgM anti-fosfatidilserina-protrombina (Anticorpo antifosfolípide)
Di Giacomo <i>et al.</i>¹⁰	2010	34	Estudo prospectivo. Dezoito pacientes (52%) com trombofilia: Anticorpos antifosfolípidos - (6/17,64%); Mutação do fator V (Leiden) - (6/17,64%); Deficiência proteínas C e/or S- (3/8,82%); Hiperhomocisteinemia - (2/5,88%), Mutação MTHFR* (1); Mutação do gene da protrombina (G20210A) (1).
			Anticorpo anticardiolipina IgM e IgG
			Mutação do gene (G20210A) da protrombina e Elevação do PAI-1**
Osada <i>et al.</i>³⁴	2010	1	Mutação do MTHFR*
Antunes <i>et al.</i>³⁵	2010	1	Mutação do Fator V (Leiden)
Tsai <i>et al.</i>³⁶	2009	1	Mutação do Fator V (Leiden) associado à mutação do gene da protrombina (G20210A), mutação da MTHFR e hiperhomocisteinemia.
Kavala <i>et al.</i>³⁷	2009	1	Mutação do Fator V (Leiden) associado à mutação do gene da protrombina (G20210A)
Irani-Hakime <i>et al.</i>³⁸	2008	1	Mutação homozigótica do gene da protrombina (G20210A)
Davis e Wysokinski³⁹	2008	1	Crioglobulinemia essencial
Anavekar e Kelly⁴⁰	2007	1	Mutação homozigótica da MTHFR sem hiperhomocisteinemia
Kawakami <i>et al.</i>⁴¹	2007	1	Mutação do gene da protrombina (G20210A) e altos níveis de PAI-1**
Cardoso <i>et al.</i>⁴²	2007	1	
Deng <i>et al.</i>⁴³	2006	1	

Continua

Autor	Ano	Nº de casos	Conclusão	
			Trombofilia detectada	
Hairston et al.²⁵	2006	1	Estudo retrospectivo. 21 pacientes (46,6%) com trombofilias: mutação heterozigótica do fator V (Leiden) (2/9 pacientes); deficiência da proteína C e/ou S (2/15 pacientes); mutação do gene da protrombina (G20210A) (1/12 pacientes); hiperhomocisteinemia (3/21 pacientes); Anticorpo anticardiolipina (8/28 pacientes); Anticoagulante lúpico (5/28 pacientes). Mutações homozigóticas da MTHFR sem hiperhomocisteinemia	
Rampf et al.⁴⁴	2006	1	Altos níveis de Fibrinogênio	
Amato et al.⁴⁵	2006	1	Hiperhomocisteinemia com insuficiência renal.	
Meiss et al.⁴⁶	2006	1	Crioglobulinemia (3/12)	
Juan et al.⁴⁷	2006	12	Criofibrinogenemia com Hiperhomocisteinemia.	
Browning et al.¹⁶	2006	1	Mutações do Fator V (Leiden)	
Lewerenz et al.⁴⁸	2004	1	Mutações do gene (G20210A) da protrombina	
Gotlib et al.²⁶	2003	1	Mutações do Fator V (Leiden)	
Hairston et al.⁴⁹	2003	1	Deficiência de Antitrombina III	
Hegemann et al.²⁸	2002	2	Mutações do Fator V (Leiden) (2); Hiperhomocisteinemia (1).	
Calamia et al.⁵⁰	2002	1	Anticoagulante Lúpico associado à Mutações do Fator V (Leiden)	
Cocuroccia et al.¹⁷	2002	3	Anticorpo anticardiolipina (3); Hipoagregação plaquetária (1); Criofibrinogenemia (1); Deficiência de Antitrombina III (1); Mutações do fator V (Leiden).	
Magy et al.⁵¹	2002	1	Deficiência de proteína C	
Tran et al.²⁹	2001	7	Anticorpo Anticardiolipina	
Boyyat et al.⁵²	2000	1	Mutações do Fator V (Leiden)	
Grasland et al.⁵³	2000	1	Síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAAF)	
Biedermann et al.²⁴	2000	1	Anticorpo anticardiolipina com elevação do PAI-1**	
Acland et al.⁵⁴	1999	4		
Klein e Pittelkow⁵⁵	1992	6		

*MTHFR: metilenoetetrahidrofolato redutase; **PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio tecidual, tipo 1.

Deficiências do sistema plasminogênio/plasmina como a diminuição da liberação do ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) ou aumento da estabilidade do inibidor do t-PA do tipo 1 (PAI-1) são observados em portadores de VL⁵⁵⁻⁵⁸. As plaquetas destes doentes também demonstram uma atividade de agregação maior²¹. Os níveis do fibrinopeptídeo A, envolvidos na formação dos polímeros de fibrina em atividade, caracterizando um estado trombogênico, também podem estar elevados⁵⁹.

Dada a heterogeneidade de fatores patogênicos envolvidos na fisiopatogenia da VL, propôs-se uma classificação etiopatogênica para VL, em primária (idiopática) e secundária, esta última subdividida em quatro grupos: (i) injúria endotelial; (ii) alterações do fluxo sanguíneo; (iii) associado a trombofilias e (iv) etiologia mista³¹.

Figura 5 - Sumário da cascata de coagulação, sistema de anticoagulação e fibrinólise [Fonte: imagem cedida pelo Dr. Paulo Ricardo Criado]

Figura 6 - Sistema fibrinolítico. Fibrinólise e participação do inibidor do ativador do fibrinogênio tecidual (PAI-1) e do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) [Fonte: imagem cedida pelo Dr. Paulo Ricardo Criado]

1.4 Achados Histopatológicos

Diante da suspeita clínica de VL, a realização de biópsia de pele para obtenção de exame anatomopatológico se faz necessária para um diagnóstico acurado. A amostra deve ser obtida de lesão recente e em caso de lesão já ulcerada a amostra deve ser obtida da borda da lesão, incluindo 2-3 mm da borda da lesão, de forma que represente a derme e o tecido celular subcutâneo¹³. De forma geral, os achados histopatológicos da VL são caracterizados pela oclusão dos vasos da derme pela deposição de fibrina intravascular e formação de trombos, hialinização segmentar e proliferação endotelial. Há infiltrado linfocitário perivascular, geralmente em grau mínimo⁶⁰. Sendo assim, são achados histopatológicos cardinais da VL os

seguintes aspectos: [i] deposição de material fibrinoide na luz vascular; [ii] hialinização da parede dos vasos; [iii] infartos teciduais e [iv] ausência de vasculite verdadeira²⁷ (Figura 7).

Figura 7 - Histopatologia da vasculopatia livedoide. Aspecto histopatológico com hialinização da parede dos pequenos vasos da derme papilar (A) e (B) e trombo ocluindo a luz do vaso (C) [Fonte: imagem obtida de exame histopatológico do caso 28]. (HE, aumento de 50x, 100x e 200x, respectivamente em A, B e C)

Segundo Hesse e Kutzner⁶⁰ a histopatologia da VL pode ser observada em vários estágios evolutivos:

(i) Estágio inicial. Nesta ocasião forma-se trombo hialino na luz dos pequenos vasos da derme superficial e por vezes nos vasos do plexo da derme média. Somente em casos esporádicos os vasos do plexo vascular da derme profunda são envolvidos. Além da presença de trombo fibrinoide na luz vascular e por vezes também, da presença de fibrina na parede vascular, pode-se em alguns casos observar este material fibrinoide depositado no estroma perivascular, o que resulta no quadro clássico de "trombo fibrinoide e anéis fibrinoides" na região do plexo vascular dérmico superficial. Este material fibrinoide pode ser claramente visualizado pela técnica histoquímica do ácido periódico de Schiff (PAS).

Além destes achados angiocêntricos, a maioria dos casos apresenta-se com ulceração suprajacente (infarto de coagulação) da epiderme e derme superficial adjacente mesmo nos estágios iniciais, às vezes, acompanhada por paraqueratose e marcada atrofia da epiderme circunjacente. A única alteração inflamatória é representada pela presença de um discreto infiltrado linfocitário perivascular e ausência de sinais de vasculite leucocitoclástica.

Neutrófilos são ocasionalmente encontrados na área da ulceração (infarto), aparentemente como expressão do processo ulcerativo necrótico (fenômeno secundário). O extravasamento de hemácias na derme superficial é significativo, e completa o quadro histopatológico da fase inicial da VL.

(ii) Estágio intermediário e tardio. Esta fase é caracterizada pela presença de vasos de parede espessada e hialinizada na derme superficial e média, por vezes com proliferação endotelial secundária. Além disso, o material fibrinoide também está presente no lúmen e na parede vascular, o qual já era observado no estágio inicial da doença. Deve-se ressaltar que estes depósitos fibrinoides (luminal e mural) são significativos para a diagnose da VL e ocorrem em todos os estágios. É importante notar que estes depósitos fibrinoides não devem ser confundidos com o fenômeno secundário análogo que ocorre sob quase toda ulceração comum. Este detalhe ressalta a importância de se biopsiar a área adjacente à ulceração ou as lesões maculosas eritemato-púrpúricas ainda não ulceradas.

As úlceras de estase sem VL exibem capilares dilatados, alongados e retorcidos e apenas perda localizada e circunscrita de capilares⁶⁰.

Nas fases finais da VL se observa esclerose dérmica e fibrose com

dilatação secundária de vasos linfáticos e depósito de hemossiderina na derme superficial e média⁶⁰.

A imunofluorescência direta geralmente demonstra deposição de imunoglobulina, fibrina e componentes do complemento^{27,60-63}. Nos estágios iniciais há depósitos de fibrina na parede dos vasos e nas fases tardias os depósitos de imunoglobulinas e complemento são detectados^{2,60,64}. Maessen-Visch *et al.*²¹ e Khenifer *et al.*²⁷ sugerem que os achados da VL observados na IFD não são específicos. Alguns autores têm interpretado o achado frequente da Imunoglobulina M (IgM) nos estudos de IFD na VL como consequência do sequestro dos grandes complexos de IgM, a qual tem peso molecular muito alto, pelos depósitos de fibrina nos vasos danificados⁶³, porém o mecanismo exato que justifique a deposição de imunocomplexos ainda não está totalmente esclarecido.

O grande desafio na diagnose histopatológica da VL é a obtenção de amostra de pele adequada, que represente desde a epiderme até a junção dermo-hipodérmica. Em essência o acometimento vascular na VL ocorre na derme superficial e média, e por vezes na derme profunda. No entanto a representação da junção dermo-hipodérmica se faz necessária uma vez que há situações onde clinicamente as lesões apresentam-se como VL, porém representam uma manifestação morfológica da poliarterite nodosa cutânea. Mimouni *et al.*⁶⁴ relataram vinte e nove casos diagnosticados como VL, porém seis deles representavam uma poliarterite nodosa cutânea subjacente, sendo que quatro destes tinham mononeurite múltipla. Na reavaliação histopatológica de biópsias profundas, estes autores observaram a presença de vasculite

necrotizante de vasos de médio calibre na derme reticular e hipoderme, enquanto que na derme superficial havia apenas vasos trombosados sem processo inflamatório, com características típicas de VL.

Portanto, os achados histopatológicos na VL permitem melhor classificá-la como *vasculopatia* e não vasculite necrotizante mediada por imunocomplexos devido à: (i) ausência de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e fragmentação nuclear na vizinhança dos vasos dérmicos no início do processo; (ii) ausência de permeação da parede vascular por leucócitos; (iii) deposição de fibrina e hialinização da parede vascular; (iv) níveis séricos normais do complemento na maioria dos doentes e ausência de imunocomplexos circulantes detectáveis⁶⁰.

Importante salientar que mesmo se respeitando os princípios para obtenção de uma amostra tecidual adequada, vale ressaltar que dada à natureza focal e segmentar das alterações vasculares da VL, múltiplas biópsias podem ser necessárias para representá-la adequadamente²⁵. Novas amostras também podem ser necessárias diante de casos graves e não responsivos a tratamentos convencionais.

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico acurado da VL requer dados precisos da anamnese, exame físico, parâmetros laboratoriais e histopatologia²⁵. Diante de quadro de úlcera cutânea em membros inferiores a primeira etapa é diferenciar quadro inflamatório (vasculites, VL, doenças auto-imunes) e não inflamatórios (insuficiência venosa crônica). Na história clínica é importante buscar sinais e sintomas de doenças auto-imunes, infecciosas, episódios de trombooses, uso de medicamentos e história familiar de trombofilias.

No exame físico é necessário observar sinais de insuficiência venosa crônica e a localização das lesões e das cicatrizes de AB. A diagnose diferencial é feita especialmente com a vasculite cutânea dos pequenos vasos (vasculite leucocitoclástica) e com a poliarterite nodosa cutânea (especialmente quando associado à mononeurite múltipla), além da síndrome do anticorpo antifosfolípide, estase venosa crônica, pioderma gangrenoso, dermatite factícia, pseudo-sarcoma de Kaposi e doença de Degos^{10,13}. A poliarterite nodosa cutânea (PAN cutânea) é o principal diagnóstico diferencial por produzir lesão cutânea muito similar à determinada pela VL, inclusive com livedo racemoso e cicatrizes de atrofia branca.

A PAN cutânea, em sua forma habitual, apresenta ainda nódulos subcutâneos principalmente nos membros inferiores¹³. A histopatologia da PAN cutânea também pode apresentar trombose de vasos da derme média e superficial, porém a presença de infiltrado neutrofílico perivascular e intramural nas arteríolas dermohipodérmicas (vasculite) confirma este

diagnóstico, o que justifica a necessidade de uma biópsia adequada que represente a junção dermohipodérmica. Biópsia de um nódulo subcutâneo também pode ser útil nesses casos¹³.

Deve-se ressaltar que a presença de cicatrizes do tipo atrofia branca de Milian (*atrophie blanche*) não é exclusiva da fase final da VL, estando presente em outras condições como no LES, esclerodermia, doença de Degos e mais frequentemente na insuficiência venosa crônica (9% a 38% dos doentes), com ou sem ulceração²¹, representando assim mera morfologia cicatricial resultante de vários tipos de injúria tecidual e não indicativa de uma entidade nosológica. Alavi *et al.*¹³ ressaltaram a importância de se considerar o diagnóstico de VL em casos de cicatrizes de atrofia branca extensos, bilaterais, acometendo o dorso dos pés¹³.

Uma vez afastadas as dermatoses que fazem diagnóstico diferencial com a VL, uma precisa avaliação laboratorial, direcionada a presença de alterações sugestivas de doenças auto-imunes do tecido conectivo, trombofilias adquiridas e congênitas, paraproteinemia e doenças virais como hepatite B e C, além do vírus da imunodeficiência humana (HIV), deve ser executada. Atenção particular deve ser dada à qualidade da biópsia cutânea, uma vez que a VL é definida em bases clínicas e histopatológicas.

Os exames mais adequados na investigação diagnóstica da VL encontram-se sumarizados no Quadro 3. Com a evolução contínua da propedêutica laboratorial das desordens da coagulação, parece-nos que as formas de VL consideradas outrora "idiopáticas" serão cada vez menos comuns⁶⁰.

Quadro 3 - Abordagem diagnóstica da vasculopatia livedoide. Exames para investigação diagnóstica

Abordagem diagnóstica	Exames complementares
Bioquímica	Glicose, ureia, creatinina, transaminases hepáticas, fosfatase alcalina, gama glutiltransferase, bilirrubinas, colesterol e frações.
Doenças auto-imunes do tecido conectivo	*FAN, **ANCA, FR, frações do complemento (C3, C4 e CH50), hemograma completo, urina tipo I.
Paraproteïnemia	Dosagem da Imunoglobulinas (IgM, IgG, IgA e IgE), eletroforese de proteínas, imunofixação, dosagem de cadeias kappa e lambda.
Neoplasias	†DHL, Hemograma completo e anamnese dos diversos aparelhos.
Doença vascular periférica	Palpação dos pulsos e Ultrassonografia com doppler arterial e venoso.
Trombofilias	I. Adquiridas: • Anticorpos Anticardiolipina (IgM e IgG) • Anticoagulante lúpico • Crioglobulinas • Homocisteína II. Congênitas: • Mutação do Fator V (Leiden) • Mutação da Protrombina • Mutação da MTHFR, hiperhomocisteinemia decorrente de defeito da metionina sintetase • Dosagem da Lipoproteína(a) • Dosagem da atividade da Antitrombina III • Dosagem da Proteína C e Proteína S • Dosagem dos Fatores VIII, IX e XI da coagulação

*FAN: fator antinuclear; ** ANCA: anticorpo anticitoplasma de neutrófilo; †DHL: desidrogenase láctica.

Monshi *et al.*⁶⁵ recentemente propôs um escore de gravidade para VL que varia de zero a seis pontos, onde se considerou como marcadores de gravidade: a dor, a presença de úlceras, livedo reticular e atrofia branca, sendo 6 o escore de maior gravidade (Quadro 4). No nosso ponto de vista, o número e o tamanho das úlceras são mais adequados na avaliação da gravidade da VL. Assim como, o livedo reticular pode ser uma resposta fisiológica normal, sendo o livedo racemoso, a forma mais observada nas vasculites e vasculopatias.

Quadro 4 - Escore de gravidade da vasculopatia livedoide. Escore de gravidade, de 0 à 6, sendo o escore 6, o de maior gravidade

Parâmetros clínicos		Escore
Livedo reticular	Ausente/Presente	0/1
Atrofia branca	Ausente/Presente	0/1
Ulceração	Pele intacta/Erosão/Úlcera	0/1/2
Dor	Ausente/Moderada/Intensa	0/1/2

Fonte: Adaptado de Monshi *et al*⁶⁵

1.6 Tratamento

O tratamento da VL ainda é um grande desafio, apesar de vários relatos de sucesso com inúmeras drogas⁴⁹, os níveis de evidência para as modalidades de tratamento atualmente propostas para a VL são baixos, basicamente baseados em relatos ou séries de casos, estando infelizmente ausentes estudos clínicos de boa qualidade. Provavelmente isto se deve em parte a relativa raridade da afecção, somado ao fato de ser doença debilitante e de grande morbidade, dificultando tais estudos do ponto de vista ético, especialmente o uso de placebo. Somado a isso, o seu caráter recorrente dificulta até mesmo a avaliação da eficácia de determinado fármaco ou medida, uma vez que a melhora da condição pode ser resultante da história natural da doença. No entanto, um parâmetro que pode auxiliar na avaliação terapêutica destes doentes é a dor.

Uma vez que há um potencial envolvimento de mecanismos trombogênicos ou deficiência do processo fibrinolítico o pilar principal do tratamento inclui medidas que de alguma forma interferem nos distúrbios hemostáticos da microcirculação. Outros pontos críticos no tratamento são o

controle da dor e em seguida a terapia compressiva nos pacientes portadores de insuficiência venosa periférica¹³.

Os principais grupos de drogas utilizadas na VL estão sumarizados no Quadro 5.

Quadro 5 - Opções terapêuticas para vasculopatia livedoide

CATEGORIAS	MEDICAMENTOS
Analgésicos	[i] Analgésicos comuns - paracetamol/dipirona [ii] AINES* [iii] Analgésicos Opioides - Codeína/Tramadol [iv] Antidepressivos tricíclicos - Amitriptilina [v] Anticonvulsivantes - Gabapentina
Antiagregantes plaquetários	[i] Ácido acetil salicílico [ii] Dipyridamol [iii] Cilostazol [iv] Tienopiridinas (clopidogrel, ticlopidina) [v] Sarpogrelato
Hemorreológico	[i] Pentoxifilina [ii] Cloridrato de blufomedil
Drogas com ação fibrinolítica	[i] Danazol [ii] rT-PA**
Anticoagulantes	[i] Warfarina [ii] Heparinas (não fracionada e baixo peso molecular) [ii] Rivaroxaban
Vasodilatadores	[i] Nifedipina [ii] Cilostazol [iii] Ácido Nicotínico
Outras modalidades	[i] Câmara hiperbárica [ii] Fototerapia com ultravioleta A (PUVA) [iii] Imunoglobulina endovenosa (IgIV) [iv] Ciclosporina [v] Iloprost endovenoso

*AINES, anti-inflamatórios não-hormonais e **rT-PA, ativador do plasminogênio tecidual recombinante.

1.6.1 Medicamentos que atuam na dor nociceptiva e neuropática

O manejo da dor na VL é de suma importância, pois ela costuma estar presente em graus variados, em todos os indivíduos, afetando profundamente suas atividades sociais e laborais, sendo um ponto crítico de atuação⁸. Ela pode ser decorrente de três fatores: (i) diretamente pela formação da úlcera, (ii) devido a oclusão vascular (podendo acometer *vasa nervorum*) e (iii) associado a insuficiência venosa coexistente. Conforme demonstrado por Hairston *et al.*²⁵, através da aferição da tensão cutânea do oxigênio (TcPO₂), a dor tem caráter isquêmico (por infarto cutâneo focal). A dor relacionada diretamente à úlcera localiza-se principalmente nas bordas da lesão e se evidencia durante a limpeza e troca de curativos, podendo ser aliviada com o uso de curativos embebidos com óleos ou vaselina e hidratando bem o curativo antes da remoção¹³. A dor que se apresenta entre as trocas de curativo podem ser decorrentes de oclusão vascular, e representa uma combinação de mecanismos nociceptivos (estímulo dependente, tipo latejante) e neuropáticos (dor espontânea, em queimação). A dor nociceptiva deve ser manejada com analgésicos comuns, incluindo *paracetamol, dipirona, ibuprofeno e opioides (codeína, tramadol ou oxycodona)*, isolados ou associados entre si⁶⁶. A dor neuropática é tratada, inicialmente, com antidepressivos tricíclicos como *amitriptilina*, começando com doses baixas à noite e em caso de insucesso, o uso de anticonvulsivantes como a *gabapentina, pregabalina ou carbamazepina*, pode ser necessário¹³. No nosso serviço, utiliza-se preferencialmente a gabapentina, via oral, na dose de 300 mg, três vezes ao dia.

A dor decorrente do edema pode estar presente em pacientes com insuficiência venosa grave, nesses quadros os sistemas não elásticos podem ser utilizados e após alívio da dor e do edema o sistema compressivo elástico pode ser introduzido¹³.

1.6.2 Drogas estimuladoras da atividade fibrinolítica endógena

O *danazol* é um esteroide anabolizante com ação androgênica atenuada que possui efeito anticoagulante e fibrinolítico, por mecanismos não totalmente esclarecidos. O danazol induz a síntese hepática de vários inibidores de protease como o inibidor de C1-estearase, α -1 antitripsina, Proteína C e S, Antitrombina-III⁶⁷ e também de proteínas do sistema de coagulação e fibrinólise como plasminogênio. Concomitantemente ele altera o perfil lipídico, elevando LDL, reduzindo o HDL e, principalmente, a Lp(a)⁶⁸. Devido a esses efeitos o danazol tem sido utilizado em pacientes com deficiência de antitrombina III, deficiência de proteína C e S, hipoplasminogenemia, angioedema hereditário, entre outras⁶⁸. Irregularidade menstrual e ganho de peso têm sido os principais efeitos colaterais encontrados em pacientes usando baixas doses de danazol e se relacionam a sua ação androgênica. Devido ao seu mecanismo de ação o danazol é contraindicado em casos de sangramento, disfunção hepática e renal, gravidez e lactação. Dosagens seriadas de bioquímica sanguínea devem ser realizadas em todos os doentes e deve-se incluir teste de gravidez em mulheres em idade fértil. O danazol é utilizado na VL em doses baixas de 200mg, via oral (100 mg, 12/12 h) com tempo médio de cicatrização de 10

semanas^{32,69,70} e duração média de seis a 12 meses de tratamento. No nosso serviço o danazol é droga de escolha em casos graves, uma vez que não dispomos da câmara hiperbárica³².

Alguns autores obtiveram boa resposta terapêutica na VL com o uso do *fator ativador do plasminogênio tecidual recombinante* (rt-PA) (Alteplase® ou Actilyse®) em baixa dose^{55,43}. Klein e Pittelkow⁵⁵ utilizaram o rt-PA na dose de 10 mg EV a cada quatro horas durante 14 dias, obtiveram rápida cicatrização das úlceras com melhora da oxigenação transcutânea em seis pacientes com VL refratária a tratamento. Deng *et al.*⁴³ utilizaram o rt-PA na dose de 10 mg EV ao dia durante duas semanas em uma paciente portadora de altos níveis do PAI-1 devido ao genótipo 4G/4G com excelente resposta. O PAI-1 é o inibidor primário tanto do t-PA quanto do ativador do plasminogênio tipo uroquinase. Mutações no gene do PAI-1 irão contribuir para redução da fibrinólise. O PAI-1 é constituído por uma glicoproteína de cadeia única sintetizada no fígado, tecido adiposo e nas células endoteliais. O gene do PAI-1 tem vários loci polimórficos, sendo o polimorfismo mais importante, a inserção-deleção 4G/5G. O alelo 4G parece ligar-se apenas ao estimulador; sendo assim o genótipo 4G/4G determina uma maior síntese do PAI-1, enquanto o alelo 5G liga-se tanto ao estimulador como ao supressor, resultando em baixo nível de transcrição. A presença do genótipo 4G/4G do PAI-1 confere aumento de 25% nos seus níveis séricos, em relação ao genótipo 5G/5G, contribuindo assim para redução da fibrinólise⁴³.

1.6.3 Drogas inibidoras da agregação plaquetária

Drogas inibidoras da síntese de prostaglandinas, inibindo a agregação plaquetária, são elas: *ácido acetilsalicílico* (AAS), *dipiridamol*, *cilostazol* ou o grupo das *tienopiridinas* (clopidogrel e hidrocloreto de ticlopidina)^{21,71}.

Diferentes autores com resposta variável utilizam AAS e dipiridamol no pacientes com VL. O AAS é um inibidor da ciclooxygenase que diminui a síntese de tromboxano A₂ e prostaglandina I₂, dessa forma inibindo a agregação plaquetária, enquanto o dipiridamol inibe a síntese de tromboxano A₂. Para a maioria dos autores o uso isolado dessas substâncias não parece obter controle satisfatório dos sintomas⁷², porém nenhum estudo clínico bem conduzido avaliou a eficácia dessas drogas nos pacientes com VL. No nosso serviço o AAS na dose de 100 mg por dia é introduzida em todos os pacientes, exceto naqueles com alguma contraindicação ou que irão utilizar anticoagulantes ou esteroides anabolizantes.

Osada *et al.*³⁴ utilizaram o *sarpogrelato* (sarpogrelate hydrochloride) uma droga antagonista do receptor 5-hidroxitriptamina_{2A} e subsequentemente da serotonina. O sarpogrelato tem ação antiagregante e vasomotora, inibindo a vasoconstrição, tendo sido usada na VL na dose diária de 300 mg, via oral. Neste caso a paciente evoluiu com neuropatia periférica e o quadro somente se estabilizou com a introdução da warfarina.

1.6.4 Drogas vasodilatadoras

A *nifedipina*, *cilostazol* (inibidor da fosfodiesterase III) e *ácido nicotínico* já foram empregados com sucesso e ainda permanecem sendo usados como terapias iniciais em casos leves^{12,73}.

1.6.5 Drogas hemorreológicas

São medicamentos que agem através da diminuição da viscosidade do sangue, diminuição da agregação de hemácias e plaquetas, aumento da flexibilidade das hemácias o que pode levar a melhora da oxigenação tecidual local. São usados na VL, a *pentoxifilina* 400 mg a cada oito horas, por via oral e o *cloridrato de buflomedil*^{71,72,74}. A pentoxifilina tem bom perfil de tolerância com poucos efeitos colaterais, porém o seu uso isolado não costuma obter bons resultados⁷⁴, dessa forma ela geralmente é associada à outra modalidade terapêutica, no nosso serviço introduzimos pentoxifilina na maioria dos pacientes em atividade, associado ou não a aspirina.

Buflomedil apresenta um efeito inibitório na agregação plaquetária e melhora a deformabilidade dos eritrócitos com fluibilidade anormal. Embora o mecanismo pelo qual o buflomedil induza estes efeitos ainda não tenha sido definido, dados iniciais sugerem que estão envolvidos, em parte efeitos antagonistas não específicos do íon cálcio e bloqueio do receptor alfa . A dose oral recomendada é de 150 mg, três a quatro vezes ao dia, ou 300 mg duas vezes ao dia.

1.6.6 Moduladoras da resposta linfocitária

A fototerapia sistêmica (Fototerapia com Ultra-Violeta A [PUVA] + metoxipsoraleno oral) tem sido empregada por alguns autores⁷⁵⁻⁷⁷. O PUVA foi iniciado com dose da UVA de 4 J/cm², aplicado duas a três vezes por semana, e com incrementos de 0,5 a 1 J/cm² a cada tratamento, conforme tolerância. A fototerapia com PUVA é efetiva no tratamento de diversas dermatoses como vitiligo, alopecia areata e linfomas cutâneos. A PUVA tem mostrado inibir o metabolismo do DNA e resposta imune mediada por células, porém o mecanismo de ação na patogênese da VL ainda é desconhecido. Níveis séricos de interleucina 2 (IL-2) e receptores de interleucina 2 são marcadores de ativação de linfócitos e já foram observados níveis elevados dessa interleucina nos pacientes com VL³, fato que poderia justificar a resposta terapêutica.

1.6.7 Terapias de mecanismos ainda pouco esclarecidos

Outros fármacos utilizados em relatos de casos foram: imunoglobulina intravenosa (IGIV)^{65,78-80}, ciclosporina⁸¹, oxigenioterapia hiperbárica^{47,82}, iloprost endovenoso⁵¹ e cessação do tabagismo^{25,79}.

Apesar do alto custo e do mecanismo de ação ainda não totalmente esclarecido, a IGIV tem sido usada com sucesso na dermatologia, em doenças auto-imunes bolhosas, nas collagenoses e vasculites, provavelmente a IGIV age através da neutralização de anticorpos circulantes e imunocomplexos depositados nos tecidos⁷⁸. Múltiplos relatos de caso com boa resposta à IGIV, na dose de 0,5 g/kg/dia, por três dias consecutivos já foram relatados em

pacientes com VL, com boa tolerância e raras complicações⁷⁹. Efeitos adversos como cefaleia, calafrios, febre, náuseas, vômitos, dispneia e taquicardia, ocorrem em menos de 5% dos pacientes tratados⁷⁹.

A ciclosporina A foi utilizada por Leclerc *et al.*⁸¹ no tratamento da VL em cinco doentes com bons resultados. Sabe-se que a ciclosporina A atua como imunossupressora da atividade linfocitária e adicionalmente a ciclosporina A parece inibir a expressão do fator tecidual em monócitos⁸³, o que poderia contribuir para seu efeito benéfico na VL. Ausência de evidências científicas consistentes, recidiva precoce e o alto índice de efeitos colaterais são fatores limitantes que impedem o seu uso de forma contínua no tratamento da VL, prestando-se, porém para tratamentos de resgate na falência de outras modalidades terapêuticas.

A oxigenioterapia hiperbárica (OTH) consiste na administração de uma fração inspirada de oxigênio próxima de um (oxigênio puro ou a 100%) em ambiente com uma pressão superior (geralmente duas a três vezes) à pressão atmosférica ao nível do mar⁸⁴. Este aumento de pressão irá resultar num aumento da pressão arterial e tecidual de oxigênio muito significativos (perto de 2000 mmHg e 400 mmHg respectivamente) o que fundamenta a maioria dos efeitos fisiológicos e terapêuticos do oxigênio hiperbárico. Em consequência da lei de Henry, ao respirar oxigênio puro em meio hiperbárico verifica-se um aumento da pressão arterial de oxigênio que pode superar os 2000 mmHg a um valor ambiental de três atmosferas absolutas (ATA). O volume de oxigênio dissolvido e transportado pelo plasma, que é mínimo à pressão atmosférica, aumenta mais de 22 vezes⁸⁴. Assim, ao calcular o

conteúdo plasmático de oxigênio (oxigênio dissolvido no plasma), verifica-se que, ao nível do mar, a quantidade de oxigênio que o plasma transporta é em torno de 0,3 mL/dL enquanto à três ATA, o oxigênio dissolvido é aproximadamente 6 mL/dL. Este último valor é suficiente para os consumos celulares em repouso sem necessidade de qualquer contribuição do oxigênio ligado à hemoglobina⁸⁴.

Nos tecidos lesionados hipóxicos, a oxihemoglobina ao contribuir para a reversão desta hipóxia, estimula também a formação da matriz de colágeno, essencial para a angiogênese e cicatrização⁸⁴. Outro efeito, já bem estabelecidos da OTH é o da melhoria da perfusão microvascular. Este efeito está provavelmente relacionado com um estímulo da síntese de Óxido Nítrico (NO) pelo oxigênio hiperbárico⁸⁴.

Em média realizam-se sessões diárias, cinco vezes na semana, num total de 20 a 30 sessões. A OTH vem sendo usando com sucesso em úlceras diabéticas e osteomielite crônica⁴⁷. Juan *et al.*⁴⁷ avaliaram oito pacientes com VL submetidos à 15 a 20 sessões de OTH em média, e observou alívio da dor em uma semana e cicatrização completa das lesões entre duas e cinco semanas, porém recidiva foi observada em seis dos oito pacientes. Na nossa experiência a OTH, por seu excelente perfil de segurança, quando disponível é a primeira escolha terapêutica em casos moderados a graves. São indicadas, em média, 30 sessões, com baixa taxa de recidiva e boa tolerância.

1.6.8 Drogas anticoagulantes

Devido aos mecanismos trombogênicos potencialmente envolvidos na VL, tratamentos baseados em medicamentos anticoagulantes têm sido frequentemente utilizados^{10,11,13}. Os anticoagulantes orais antagonistas da vitamina K, especialmente a varfarina têm sido empregados por vários autores^{10,37,39,40}. O *International Normalized Ratio* (INR) geralmente é mantido entre 1,5 a 2,0¹⁰. Deve-se utilizar doses baixas no início do tratamento, não excedendo 1 a 2 mg ao dia, com incrementos diários lentos de 1 a 2 mg até se alcançar a dose necessária para atingir o INR desejado⁸⁵, ou associá-la nos primeiros três a cinco dias com heparina subcutânea. Esta prática tem sido utilizada para se evitar o consumo rápido das proteínas de anticoagulação vitamina K-dependentes (proteína C, S e antitrombina), o que pode determinar o quadro de "necrose cutânea induzida por cumarínicos", efeito adverso raro que ocorre em 0,01 a 1% dos pacientes⁸⁵. A varfarina tem sido mantida pelo nosso grupo até cerca de um a dois meses após a cicatrização das lesões, quando então é cessada e reintroduzida se necessário, evitando-se assim os riscos de sangramento inerentes à anticoagulação prolongada¹⁰.

Outra modalidade de anticoagulação, de mais fácil manejo, a qual se tem dado preferência, é o uso de heparina via subcutânea¹⁰. Vários autores têm utilizado mini-doses de heparina ou mesmo doses plenas de anticoagulação^{10-12,49,42,46,86-90}. Tanto a heparina não-fracionada (HNF) como as heparinas de baixo peso molecular (HBPM) têm emprego estabelecido na prevenção e tratamento do tromboembolismo venoso (TEV) e como terapia adjuvante nas síndromes ateroembólicas⁹¹. As HBPM estão substituindo as

HNF na terapêutica anticoagulante devido a um número de vantagens, que incluem um perfil farmacocinético mais previsível e facilidade do uso. Entre as HBPM mais utilizadas encontram-se a enoxaparina e a dalteparina⁹¹.

A enoxaparina apresenta meia-vida de eliminação de quatro horas e meia⁹¹. As doses profiláticas preconizadas da enoxaparina variam de 30 mg, duas vezes ao dia, via subcutânea (SC) ou 40 mg ao dia, de acordo com o porte da cirurgia e o risco de trombose associado a mesma⁹¹. A dose terapêutica preconizada para trombose venosa profunda com ou sem embolia pulmonar é de 1 mg/kg, via SC, duas vezes ao dia, associado a varfarina⁹¹.

A dalteparina tem meia-vida de eliminação de três a cinco horas. As doses profiláticas preconizadas da dalteparina variam de 2.500 UI à 5.000 UI, uma vez ao dia, via SC. A dose terapêutica preconizada para trombose venosa profunda com ou sem embolia pulmonar é de 1 mg/kg, via SC, duas vezes ao dia, associada a varfarina⁹¹.

As heparinas, especialmente as HBPM, apresentam efeito antitrombóticos: (i) via efeito anti-Fator Xa da cascata de coagulação; (ii) aumentando também a atividade fibrinolítica por elevar a atividade do ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e, (iii) liberar o inibidor da via do fator tecidual (TFPI)⁶⁰. As HBPM também possuem ação antiinflamatória através de: (i) ação inibidora sobre a expressão da P-selectina⁶⁰, (ii) redução da expressão do ICAM-1 nas células endoteliais e (iii) diminuição, dose-dependente, da expressão de metaloproteinases da matriz extracelular^{60,92}.

As doses indicadas das HNF e das HBPM para o tratamento da VL ainda não estão estabelecidas^{10,49}. Hairston *et al.*⁴⁹ utilizaram enoxaparina

em dois doentes na dose de 2 mg/kg/dia, e posteriormente 1 mg/kg/dia. Di Giacomo *et al.*¹⁰ utilizaram doses de enoxaparina 40 mg/dia (cinco doentes), dalteparina (três doentes) 5.000 UI/dia e heparina não-fracionada (três doentes) 5.000 UI a cada 12 horas. Os autores observaram significativo alívio da dor nestes doentes nas primeiras duas semanas de tratamento.

A monitorização do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) com as HBPM não é necessário⁴⁸. Os efeitos adversos das HBPM incluem episódios hemorrágicos de grau menor e maior (incluindo sangramento intracraniano ou retroperitoneal), plaquetopenia e osteoporose⁴⁸. Os doentes devem ser orientados quanto à possibilidade de eventos hemorrágicos, bem como serem observadas rigorosamente as contraindicações de anticoagulação antes de se iniciar o tratamento. Além disso, o risco de osteoporose também deve ser avaliado ao se utilizar o tratamento com heparina, , orientando-se assim a suplementação da dieta com cálcio⁴⁸.

Apesar do risco de sangramento e custo mais elevado, as HBPM são indicadas para doentes portadores de trombofilias ou com doença resistente a outras abordagens^{48,49}.

Recentemente, uma nova classe de anticoagulantes, os inibidores do fator Xa surgiram no mercado e revolucionaram a terapia anticoagulante. Os inibidores do fator X, principalmente, rivaroxaban, apixaban e dabigatran, tem mecanismo de ação similar, se ligando de maneira irreversível ao fator X e impedindo a transformação de protrombina em trombina. Os inibidores do fator X parecem oferecer inúmeras vantagens em relação aos anticoagulantes orais antagonistas da vitamina K e as heparinas, por possuírem um perfil

farmacocinético mais previsível, administração oral, pouca interação com drogas e com alimentos e não necessitarem de monitorização do efeito anticoagulante⁹³. O rivaroxaban tem se mostrado superior a enoxaparina na prevenção de fenômenos trombóticos^{93,94}, porém com maior risco de sangramentos⁹³. A dose preconizada para profilaxia de trombose pós-operatória é de 10 mg uma vez ao dia. Nos últimos anos, inúmeras publicações tem analisado a resposta da VL ao rivaroxaban⁹⁵⁻⁹⁹. Weishaupt *et al.*⁹⁹ analisaram em estudo multicêntrico não controlado, vinte pacientes com VL tratados com rivaroxaban (10 mg, duas vezes ao dia e após controle da dor, 10 mg ao dia) e observaram através de escala visual analógica, melhora da dor em 12 semanas. Efeitos colaterais foram observados em oito pacientes (24%), sendo a maioria sangramentos leves, exceto uma paciente que apresentou menorragia grave, levando a suspensão do tratamento.

Dessa forma os inibidores do fator X apesar de todas as inovações, facilidades de uso e menor custo comparado a enoxaparina, parece ter maior risco de sangramento, exigindo maior critério na seleção do paciente e no seguimento durante o tratamento. No nosso ponto de vista a anticoagulação com heparina ou com rivaroxaban deve ser tratamento de escolha da VL associada à trombofilias de alto risco ou com antecedente de trombose. Nos demais casos a câmara hiperbárica e danazol apresentam melhor perfil de segurança, devendo ser tratamentos preferenciais nos pacientes com VL.

No Quadro 6 pode-se consultar as diferentes terapias anticoagulantes empregadas no tratamento da VL, cujos artigos publicados estão indexados no Medline (PubMed).

Quadro 6 - Terapia anticoagulante para vasculopatia livedoide. Dados da literatura referentes ao uso de terapias anticoagulantes encontrados no pubMed

Tratamento	Dose e posologia	Autores	Ano	N	Presença de trombofilia
Heparina	Heparina não-fracionada	Jetton e Lazarus ⁸⁹	1983	1	Ausente
	5.000UI via *SC a cada 3 dias	Heine e Davis ⁸⁸	1986	1	Ausente
	5.000UI, *SC 12/12 h	Yang <i>et al.</i> ⁶³	1991	19	Ausente
	5.000UI via *SC ao dia	Deng <i>et al.</i> ⁴³	2006	1	Homozigose do promotor (4G/4G) do inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (PAI-1)
	rtPA 10mg/dia **EV, por 2 sem → 5.000UI, SC, 12/12h				
	5.000UI, *SC, 12/12h [2 casos] e 1xdia [1 caso]	Di Giacomo <i>et al.</i> ¹⁰	2010	3	Ausente
	Enoxiparina 30mg, *SC, 12/12h	Hairston <i>et al.</i> ⁴⁹	2003	1	Mutação do fator V (Leiden)
	Enoxiparina 1mg/kg, *SC 12/12h.	Hairston <i>et al.</i> ⁴⁹	2003	1	Ausente
	Enoxiparina *SC (40mg/dia)	Meiss <i>et al.</i> ⁴⁶	2006	1	Hiperhomocisteinemia por insuficiência renal crônica
	Dalteparina 2.500UI/dia, *SC, 14 dias e após 48/48h	Hesse e Kutzner ⁶⁰	2008	16	Ausente
	Nadroparina 2.850UI/dia, *SC	Hesse e Kutzner ⁶⁰	2008	4	ND
	Enoxiparina	Hesse e Kutzner ⁶⁰	2008	2	ND

Continua

Tratamento		Dose e posologia		Autores		Ano	N	Presença de trombofilia		Conclusão
		Enoxiparina 20mg/dia, *SC +Metilprednisolona †VO.		Cardoso <i>et al.</i> ⁴²		2007	1	Síndrome de Sjögren e mutação da MTHFR com níveis normais da homocisteína		
		Enoxiparina		Goerge <i>et al.</i> ⁵		2010	1	Elevação níveis Lp(a)		
		Dalteparina		Di Giacomo <i>et al.</i> ¹⁰		2010	3	Anticorpos anticardiolipina IgM e IgG (1 paciente)		
		Enoxiparina 40mg/dia, via *SC		DiGiacomo <i>et al.</i> ¹⁰		2010	5	Mutação do fator V (Leiden) [1] e deficiência da proteína C e S [1].		
Varfarina				Deng <i>et al.</i> ⁴³		2006	1	Homozigose do promotor (4G/4G) do inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (PAI-1)		
				Browning e Callen ¹⁶		2006	1	Criofibrinogenemia e hiperhomocisteinemia		
				Anavekar e Kelly ⁴⁰		2007	1	Mutação heterozigota do gene da protrombina		
				Davis e Wysokinski ³⁹		2008	1	Mutação heterozigota do fator V (Leiden)		
				Kavala <i>et al.</i> ³⁷		2008	1	Mutação do fator V (Leiden)		
				Osada <i>et al.</i> ³⁴		2010	1	Ausente		
				Di Giacomo <i>et al.</i> ¹⁰		2010	5	Mutação do fator V (Leiden) [2]		
Rivaroxaban		10mg, †VO, 12/12h		Kerk <i>et al.</i> ⁹⁵		2013	2	Elevação dos níveis de Lp(a)		
Rivaroxaban		10 mg, †VO, 12/12h		Weishaupt <i>et al.</i> ⁹⁹		2016	20	Elevação da Lp(a), mutações do fator V e do gene da protrombina, crioglobulinemia, SAF, hiperhomocisteinemia, deficiência de proteína C e S, deficiência do PAI-1		

* SC: via subcutânea; **EV: via endovenosa; †VO- via oral.

1.7 Endotélio na vasculopatia livedoide

O endotélio recobre toda superfície interna do sistema vascular, sendo composto por uma monocamada de células¹⁰⁰. O endotélio vascular é muito versátil e multifuncional, apresentando muitas funções de síntese e metabólicas, incluindo a regulação da trombose e fibrinólise, aderência plaquetária, modulação do fluxo e tônus vascular, além da regulação dos fenômenos imunes e respostas inflamatórias, controlando as interações dos leucócitos com a parede vascular. Perturbações na estrutura endotelial e suas funções podem resultar em condições patológicas¹⁰⁰. Disfunção hemostática, aterosclerose, resposta imune e inflamatória alteradas são exemplos onde, as células endoteliais exercem papel crítico.

Sob condições basais o endotélio está intimamente envolvido na manutenção de uma interface tecido-sangue não-trombogênica pela regulação da trombose, fibrinólise, aderência plaquetária, tônus vascular e fluxo sanguíneo¹⁰¹. A superfície do endotélio saudável voltada ao lúmen vascular é tanto anticoagulante como antitrombótica: as células endoteliais (CEs) secretam uma variedade de moléculas importantes para a regulação da coagulação sanguínea, como para a função plaquetária¹⁰¹. Os vasos danificados ou expostos a certas citocinas ou estímulos pró-inflamatórios muda este balanço das CEs do estado de anticoagulante/antitrombótico para o fenótipo pró-coagulante/pró-trombótico¹⁰¹.

A injúria endotelial e consequente disfunção endotelial (DE) pode ser consequência do desequilíbrio entre fatores de relaxamento e de contração vascular, pró e anticoagulantes ou agentes inibidores e estimuladores do

crescimento de células endoteliais¹⁰². O dano endotelial pode resultar de fatores mecânicos ou bioquímicos ou estimulação endotelial por uma secreção inapropriada ou fisiopatológica. A disfunção endotelial pode se manifestar como vasoespasmo, trombo, hipertensão e aterosclerose¹⁰². No entanto a hipertensão e aterosclerose podem ser causa da DE. Uma vez que a DE tenha se iniciado, vários fatores celulares participam do seu desenvolvimento e manutenção. A inflamação, oxidação de lipoproteínas ou outros estresses oxidativos podem frequentemente atuar na participação da DE¹⁰².

Em estado quiescente as CEs mantêm a fluibilidade sanguínea por promover a atividade de numerosas vias anticoagulantes, sendo a mais importante a via da proteína C/proteína S¹⁰⁰. A via da proteína C/proteína S é iniciada quando a trombina gerada na coagulação interage com o receptor trombomodulina expresso nas CEs. A proteína C ativada inativa os fatores VIIIa e Va da coagulação (Figura 5). Deficiência de proteína C e S favorecem a trombose e estão associadas a VL¹⁰. Anticorpos antifosfolípidos podem atuar impedindo a ação da proteína C e S, assim como induzindo lesão endotelial. O complexo formado entre trombina e trombomodulina previne a capacidade da trombina de polimerizar o fibrinogênio no coágulo ou ativar plaquetas¹⁰⁰.

O Fator Tecidual (FT) é uma proteína de membrana e membro da família do receptor de citocina tipo II. O FT é expresso naturalmente nas células da adventícia e camada média dos vasos sanguíneos, iniciando instantaneamente a cascata de coagulação frente ao dano vascular¹⁰³. O FT é inibido pelo inibidor da via do fator tecidual, o qual é predominantemente

sintetizado pelas células endoteliais em condições basais, e fisiologicamente se liga à superfície das células endoteliais¹⁰¹. Atualmente sabe-se que o FT pode ser induzido em monócitos após processo inflamatório. A expressão do FT *in vivo* nos monócitos parece estar restrita a algumas condições patológicas, tais como sepse e aterosclerose, a partir de estímulos inflamatórios específicos, tais como endotoxina (lipopolissacárides), ésteres de forbol, proteína C reativa, mediadores pró-inflamatórios, tais como $\text{TNF}\alpha$, interleucina (IL-1) e a Lp(a) ^{103,104}. Observou-se que doentes com síndrome coronária instável e estável demonstram níveis elevados de expressão do FT nos monócitos circulantes. Esta expressão inapropriada de FT nos monócitos é responsável pela deposição de fibrina, em uma variedade de condições patológicas, tais como CIVD associada à sepse e doença tromboembólica¹⁰³.

Os principais agentes antiplaquetas secretados pelas CEs são as prostaciclina (PGI₂) e NO. Ambos inibem a agregação plaquetária¹⁰⁰. PGI₂ e NO são naturalmente liberados pelas células endoteliais, porém sua síntese é aumentada em resposta a uma variedade de agonistas, notadamente por moléculas envolvidas na cascata de coagulação (bradicinina e trombina), ou secretadas pelas plaquetas agregadas (adenosina trifosfato- ATP) e assim limitando a extensão intravascular do trombo formado¹⁰⁰. A função vascular pode ser avaliada através da medida da vasodilatação fluxo-mediada (VFM) da artéria braquial medida através de ultrassom de alta resolução. A VFM é um método não invasivo e bem estabelecido onde uma hiperemia reativa induzida pela isquemia transitória do antebraço pode aumentar o fluxo sanguíneo gerando um estresse de cisalhamento na parede do vaso, o que leva à

liberação do óxido nítrico endotelial e a dilatação vascular⁵⁷. Alteração da VFM já foi observada na vasculopatia livedoide⁵⁷, aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes¹⁰⁵ e síndrome do anticorpo antifosfolípide¹⁰⁶. A existência de algum distúrbio na liberação do NO pelo endotélio levando a uma maior agregação plaquetária e trombose local poderia justificar fenômenos vaso-oclusivos.

O endotélio também participa da fibrinólise pela liberação do t-PA e ativador tipo uroquinase, determinando a transformação do plasminogênio em plasmina, a qual degrada o trombo, por digerir a rede de fibrina¹⁰⁰ (Figura 6). O t-PA é naturalmente liberado pela CEs, enquanto que a uroquinase é apenas sintetizada pelas CEs ativadas¹⁰⁰.

O inibidor natural do t-PA, denominado PAI-1 é também naturalmente secretado pelas células endoteliais. O balanço entre t-PA e PAI-1, o qual é normalmente em favor do t-PA é também alterado por citocinas ou mutações genéticas que levam a diminuição da liberação do t-PA, aumento da produção ou maior estabilidade do PAI-1¹⁰⁰.

A inibição do sistema fibrinolítico ocorre tanto no nível dos ativadores do plasminogênio, que bloqueiam diretamente o tPA, pela ação do PAI-1, como no nível da plasmina, pela ação da α_2 - antiplasmina. Na manutenção da homeostase sanguínea a interação entre os diversos componentes do sistema fibrinolítico permite que apenas uma pequena quantidade de cada enzima seja ativada e que esta ativação restrinja-se ao local da alteração do vaso, evitando assim a propagação do processo para todo o leito vascular, o que acarretaria a coagulação de todo leito vascular sanguíneo.

1.8 Lipoproteína(a)

A lipoproteína(a) foi descrita, primeiramente em 1963 por Berg e tem ganhado considerável interesse clínico desde a descoberta de sua forte associação com doenças cardiovasculares¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. A Lp(a) é uma molécula complexa que consiste de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL) ligada a uma glicoproteína, apolipoproteína(a) [Apo (a)]¹¹⁰ (Figura 8).

Figura 8 - Estrutura da Lipoproteína(a). Core central de LDL (lipoproteína de baixa densidade, contendo ésteres de colesterol (EC) e triglicérides (TG), conectada à apolipoproteína B-100 (Apo B-100), a qual por pontes dissulfeto (S-S) se liga à Apo(a). A Apo(a) possui vários domínios Kringles (K), sendo os KI e IV similares ao plasminogênio, e uma porção terminal protease inativa (P) [Fonte: Criado *et al.*³¹]

A Apo(a) é estruturalmente similar ao plasminogênio, estando seus respectivos genes interligados no cromossomo 6q26-27¹⁰⁸. Ambas as proteínas contêm estruturas conhecidas como domínios Kringle. Os Kringles

1 e 4 do plasminogênio contém sítios de ligação a lisina (LBS- *lysine bindings sites*) que interagem com os resíduos de lisina da fibrina, antes da formação da plasmina. Essas características permitem que a Apo(a) possa competir com o plasminogênio de uma forma lisina-dependente, inibindo a fibrinólise¹¹¹.

1.8.1 Regulação da síntese

A Apo(a) contém dez tipos de repetições similares ao plasminogênio no domínio kringle 4 (K-IV), um desses, o K-IV tipo 2, esta presente em número variável, determinado pelo polimorfismo genético¹⁰⁹. O polimorfismo do gene que codifica a Apo(a) permite variação do seu peso molecular, que vai de 200 a 800 kDa¹⁰⁸. As isoformas menores são as mais semelhantes aos plasminogênio, portanto são as que possuem maior ação antifibrinolítica¹⁰⁹ (Figura 9).

Figura 9 - Similaridade entre Apo(a) e plasminogênio. Variação no número de domínios K-IV tipo 2 determinando isoformas distintas da lipoproteína(a). Isoformas menores se assemelham mais ao plasminogênio, portanto são mais patogênicas, além de induzirem maiores níveis séricos [Fonte: adaptado de Galvano *et al.*¹¹¹]

O gene da Apo(a) é formado por dois alelos e a expressão combinada dos dois irá determinar o nível sérico da Lp(a), através da taxa de síntese da Apo(a). A síntese da Apo(a) é determinada por um mecanismo complexo e ainda não totalmente esclarecido¹⁰⁸. A Lp(a) é sintetizada no fígado e o local da ligação entre apoB-100 e apo(a) é incerto, sendo o mais provável a superfície celular do hepatócito, mas ligação extracelular é possível¹¹². As menores isoformas são produzidas mais rapidamente do que as maiores isoformas, o que pode justificar níveis plasmáticos mais elevados das menores isoformas. No entanto, como as dosagens séricas das Lp(a) são realizadas por meio de anticorpo anti-Apo(a), as maiores isoformas, por sua

vez, podem ter sua dosagem superestimada¹¹². Os níveis séricos da Lp(a) variam de <1 mg/dL à >1000 mg/dL e são determinados, principalmente pelo polimorfismo genético da Apo(a) [90%]¹¹². Estudos de cinética da Lp(a) revelam que a sua concentração é, principalmente, determinada pela síntese do que pelo catabolismo. A transcrição dos genes envolvidos no metabolismo da Lp(a) é fortemente influenciado por fatores de transcrição, como os fatores nucleares hepatocitários 1 α e 4 α , receptores nucleares como o receptor farnesoide X (FXR- farnesoid X receptor), hormônios sexuais e proteínas de fase aguda. O FXR parece ter papel importante na regulação do gene da apo(a)¹¹³, uma vez que se observa níveis muito baixos de Lp(a) em pacientes com colestase, decorrente do efeito supressor dos sais biliares nos receptores FXR¹¹³. A Interleucina-6 (IL-6), considerada um reagente de fase aguda também parece ter importante ação reguladora do gene apo(a). O uso do tocilizumab, inibidor de IL-6, num paciente com artrite reumatoide reduziu os níveis séricos da Lp(a) em 30%¹¹⁴. Da mesma forma, o polimorfismo do gene da IL-6 174G/C é significativamente associado a altas concentrações de Lp(a)¹¹³. Outros fatores influenciam os níveis séricos da Lp(a), sendo um dos mais significativos o fator racial, com os negros afro americanos apresentando níveis de Lp(a) até 4x maiores do que caucasianos e orientais. No Quadro 7 pode-se observar outros fatores determinantes dos níveis plasmáticos da Lp(a)¹¹³.

Quadro 7 - Lipoproteína(a). Principais fatores que influenciam os níveis plasmáticos de Lp(a) em humanos. Adaptado de Kostner *et al.*¹¹⁴

FATORES	EFEITO NA LP(A)	COMENTÁRIOS
Genéticos		
• Apo (a)	Principal determinante do nível sérico da Lp(a) (90%)	Pode variar de 30-50%
• Racial	Aumenta em 4x	Americanos afrodescendentes possuem níveis 4x maiores que caucasianos.
• IL-6	Promotor da síntese da Lp(a)	
Não-genéticos		
• Fase aguda	Aumento em 1-2x	Os achados da literatura ainda são controversos
• Doença renal	Aumento em 3x	
• Doença hepática	Redução em até 90%	Principalmente nos quadros colestáticos
Medicamentos		
• Esteroides anabolizantes	Até 70% de redução	Não é liberado para uso clínico
• Ácido Nicotínico	20%-30% de redução	
• Estatinas	Inconsistente	Pode reduzir ou elevar os níveis séricos
• Ácido acetil salicílico	10%-20% de redução	Efetivo mesmo em baixas doses
• Aférese de LDL/Lp(a)	80% de redução	Parece diminuir o risco cardiovascular

1.8.2 Processo de degradação

O fígado parece ser o maior órgão de degradação da Lp(a). Estudos *in vivo* mostram que 50% da Lp(a) é degradada no fígado, seguido do rim, baço e músculos¹¹³. A Lp(a) se liga a receptores de LDL, tipo Megalina, a receptores de VLDL (*very low density lipoprotein*) e receptores de plasminogênio presentes nas membranas celulares de vários epitélios e de células como fibroblastos e macrófagos. A Lp(a) através da ligação às células endoteliais e à matriz extracelular (MEC) se acumula nas paredes do vasos, induzindo a formação da placa aterosclerótica e formação de trombos. A afinidade da Lp(a) a MEC é maior do que da LDL e do plasminogênio¹¹². A Lp(a) se liga a várias proteínas

da MEC como fibronectina, fibrina, colágeno tipo IV e laminina, todas proteínas que compõem a parede vascular, o que fortalece o seu papel como pro-aterogênica¹¹². Estudos *in vitro* sugerem que enzimas proteolíticas são responsáveis pela degradação da apo(a) em dois fragmentos, F1 e F2, no domínio N-terminal e C-terminal, respectivamente, sendo as principais enzimas, as metaloproteinases e as elastases de neutrófilos e macrófagos¹¹².

1.8.3 Modificações oxidativas

Modificações oxidativas podem ocorrer com a Lp(a), similar ao que ocorre com as lipoproteínas em geral¹¹². A oxidação das lipoproteínas pode ser o evento inicial na formação da placa aterosclerótica através da indução de quimiotaxia para macrófagos na parede vascular e posterior aumento de receptores de “eliminação” (*scavenger receptor*) que de forma desenfreada fagocitam essas partículas oxidadas, formando macrófagos repletos de lipoproteínas, conhecidos como células espumosas. Paralelamente, a Lp(a) oxidada [Lp(a)ox] diminui a vasodilatação endotélio-dependente mais do que a LDL oxidada, através da formação de oxigênio (O_2) e subsequente inativação do NO. Outro mecanismo relacionado à Lp(a)ox seria a formação de anticorpos anti-Lp(a)ox^{115,116}. A presença de anticorpos anti-Lp(a)ox tem sido observado em doenças auto-imunes que cursam com fenômenos trombóticos, como LES e Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide (SAF)^{115,116}. A principal hipótese é que a doença auto-imunes de base, associada ao processo oxidativo desencadearia a formação desses anticorpos¹¹⁵. Para a maioria dos autores, esses anticorpos podem ter um papel fundamental no

aumento do risco de eventos trombóticos arteriais e venosos nesses pacientes¹¹⁵. Curiosamente, dois achados devem ser pontuados: (i) os anticorpos anti-Lp(a) são observados principalmente, em pacientes com anticorpos antifosfolípidos, o que pode sugerir uma reação cruzada entre fosfolípidos e lipoproteínas oxidadas e (ii) a presença dos anticorpos anti-Lp(a) não estão necessariamente, relacionados a níveis elevados de Lp(a). Portanto o papel dos anticorpos anti-Lp(a) na indução de aterosclerose e trombose parece ser importante, mas não está totalmente esclarecido.

1.8.4 Papel fisiológico e patológico da Lp(a)

As funções fisiológicas da Lp(a) ainda não são completamente entendidas, mas seus efeitos fisiopatológicos parecem estar relacionados às propriedades da Apo(a). Apesar de conter uma molécula de LDL, a Lp(a) não participa do transporte de lípidos no plasma, não sofre influência da dieta e da idade e não responde a terapia hipolipemiante padrão. Em concentrações normais a Lp(a) parece participar de processo reparativo da parede vascular e da cicatrização de feridas, provavelmente pela sua capacidade de ligação a proteínas da matriz extracelular^{117,118}. A Lp(a) tem mostrado reagir com glicosaminoglicanos, fibrina, β 2-glicoproteína I e fibronectina entre outras proteínas da matriz extracelular envolvidas na formação da placa aterosclerótica e reparo tecidual^{108,119,120}. A Lp(a) também exerce efeito regulador sobre o sistema de coagulação e fibrinólise, principalmente inibindo a ativação do plasminogênio²³, através da inibição do tPA¹⁰⁸, aumento da expressão do PAI-1, competição com o plasminogênio

nos receptores endoteliais e inativação do TFPI (Figura 6)^{108,110,120}. A nível vascular a Lp(a) tem efeito inibidor sobre a atividade do fator de crescimento tecidual beta (TGF- β)¹¹⁰, induz quimiotaxia de monócitos¹¹⁰ e aumenta a proliferação de células musculares lisas¹⁰⁸, células endoteliais e células espumosas^{110,120}. Um provável efeito anti-tumoral é descrito para Lp(a), mas as evidências são escassas¹¹⁰. Portanto a Lp(a), devido a sua complexa estrutura teria um efeito pleiotrópico com múltiplas funções: pró-aterosclerótica (LDL-símile), antifibrinolítica [Apo(a)- plasminogênio símile], pró-coagulante (ação no fator tecidual), reparo tecidual e anti tumoral¹¹⁹. A Figura 10 sumariza todas as ações da Lp(a) já descritas na literatura.

Figura 10 - Síntese de todas as ações da lipoproteína(a). A figura demonstra o efeito pleiotrópico da Lp(a), ou seja, uma única molécula capaz de induzir inúmeras ações patológicas. Legenda: TGF- β indica Fator de Crescimento Tecidual β , LDL - Low Density Lipoprotein, HDL - High Density Lipoprotein, PAI-1- Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tecidual tipo 1 [Fonte: adaptado de Siekmeier *et al*¹¹⁹]

A Lp(a) exibe um perfil de concentração muito variável em distintas populações com a maioria dos indivíduos apresentando níveis séricos baixos, enquanto em grupos de portadores de doenças cardiovasculares as curvas de distribuição tendem a se desviar para maiores concentrações¹⁰⁸. Níveis séricos acima de 30 mg/dL são considerados elevados¹⁰⁸ e para a maioria dos autores níveis elevados de Lp(a) constitui a variação genética mais fortemente associada a doença^{108-110,114}. Kamstrup *et al.*¹²⁰ demonstraram relação positiva entre Lp(a) [genótipo kringle IV tipo 2] e estenose aterosclerótica de coronárias, carótidas e artérias femorais.

Sofi *et al.*¹²¹ publicaram uma meta-análise de seis estudos caso-controle de pacientes adultos demonstrando uma relação positiva entre tromboembolismo venoso e níveis de Lp(a) > 30 mg/dL. Porém essa relação parece ser significativa apenas em altos títulos.

Spence e Koschinsky¹²² sugerem que a Lp(a) exerce dupla função: aterosclerótica e trombótica e isso justificaria seu papel nas doenças cardiovasculares e nas trombooses (Figura 11).

Figura 11 - Ações protrombótica e proaterosclerótica da lipoproteína(a). O diagrama de Venn descreve uma série de fatores que contribuem potencialmente para a trombose venosa (lado esquerdo) e aterotrombose (lado direito). Um subconjunto destes fatores que são influenciados pelos níveis de Lp (a) está contido nos círculos cheios; nota que todos os fatores potencialmente contribuintes para a trombose venosa, que são influenciados pelos níveis de Lp (a) são comuns com a aterotrombose (centro). Fatores que contribuem unicamente para a trombose venosa ou aterosclerose, e não são influenciados pelos níveis de Lp (a), estão contidos nos círculos abertos. Legenda: CE indica célula endotelial; MEC, matriz extracelular; HDL, lipoproteínas de alta densidade; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; PAI-1, inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1; PL, fosfolípidos; CML, células do músculo liso; TFPI, fator inibidor da via do fator tecidual [Fonte: adaptado de Spence e Koschinsky¹²²]

Níveis elevados de Lp(a) têm sido descritos em inúmeras doenças auto-imunes como na SAF, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e em dermatoses inflamatórias como a psoríase^{116,123}.

Recentemente alguns autores têm observado níveis elevados de Lp(a) na VL^{5,30,31} e de forma surpreendente, a associação da VL com aterosclerose já foi descrita numa revisão conduzida na Mayo Clinic em 1984, mostrando que sete de 42 pacientes tinham calcificação de aorta e aterosclerose ou aneurisma (Figura 12)¹²⁴. Outro estudo retrospectivo de seguimento por 10 anos, também encontrou relação com acidente vascular

cerebral e doença arterial oclusiva periférica²⁵. Achados que contribuem para a suspeita desta interação da Lp(a) na patogênese da VL estão agrupados e sintetizados na Figura 12.

Figura 12 - Evidências de associação da lipoproteína(a) com a vasculopatia livedoide. O diagrama de Venn demonstra a correlação da VL com a Lp(a), revelando no círculo vazio da esquerda fatores que contribuem potencialmente para a trombose venosa em pacientes com VL, independentes da Lp(a). Um subconjunto destes fatores que são influenciados pelos níveis de Lp(a) está contido nos círculos cheios; a Lp(a) determina disfunção endotelial e aumento da expressão e atividade do PAI-1 o que também já foi descrito em séries de doentes com VL^{57,58}, porém sem aferição dos níveis da Lp(a) nestas séries. A Lp(a) também está relacionada a indução de anticorpos^{54,125-127} e formação de imunocomplexos¹²⁸, que podem justificar os achados de imunofluorescência direta e presença de anticorpos antifosfolípide na VL. A resposta terapêutica ao danazol, ácido nicotínico e r-TPA também pode estar relacionado a Lp(a). Apesar dos dados escassos, os achados de aterosclerose (círculo vazio a direita) em pacientes com VL já foram descritos e podem estar relacionados a Lp(a)^{25,124}. Legenda: AVC, acidente vascular cerebral; PAI-1, inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1; r-TPA, ativador do plasminogênio tecidual recombinante [Fonte: adaptado à semelhança de Criado *et al.*³¹]

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Avaliar a expressão sérica e tecidual da Lp(a) nos pacientes portadores de VL e comparar esses achados com amostras de pele aparentemente normal, de voluntários sadios e com amostras de sangue de pacientes com outras dermatoses.

2.2 Objetivo Secundário

Analisar se há correlação dos níveis teciduais e séricos entre si ou com outras variáveis paramétricas e não paramétricas, como a presença de outros fatores de hipercoagulabilidade, gênero e idade.

3 MÉTODOS

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 protocolo de número 10.416 (Anexo A). Todos os sujeitos incluídos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

3.1 Casuística

De forma prospectiva, foram avaliados trinta e oito pacientes (vinte e sete mulheres e onze homens com uma idade média de 37 anos) com diagnóstico clínico e histopatológico de vasculopatia livedoide, em acompanhamento no ambulatório de Vasculites da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos foram submetidos a biópsias de lesões cutâneas ativas e coleta de sangue periférico para análise dos níveis séricos de Lp(a).

A. Os ***pacientes portadores de VL*** foram selecionados segundo os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- Doentes maiores de 18 anos;

- Diagnóstico clínico compatível com VL (úlceras estelares muito dolorosas nos membros inferiores associadas a lesões purpúricas e cicatrizes branco-nacaradas simultaneamente ou não);
- Diagnóstico histopatológico de VL.

Critérios de exclusão:

- Idade inferior a 18 anos;
- Gestantes;
- Impossibilidade de submeter-se aos exames complementares solicitados (coleta de sangue, biópsia da pele acometida e ultrassonografia doppler venoso e arterial dos membros inferiores).

B. **Grupo controle de pele** - formado por voluntários e por pacientes que foram selecionados no ambulatório de cirurgia dermatológica da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram obtidas amostras de pele aparentemente sã de nove pacientes, sendo cinco mulheres e quatro homens com idade média de 55 anos. Todas as amostras foram provenientes de pele dos membros inferiores.

C. **Grupo controle de sangue** - constituído de setenta pacientes (sendo quarenta e cinco mulheres e vinte e cinco homens com idade média de 51 anos) da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, portadores de diferentes dermatoses e selecionados aleatoriamente na triagem do

ambulatório, cuja seleção obedeceu a proporção de um indivíduo convidado a participar do estudo a cada 10 atendimentos na triagem. Foram coletadas amostras de sangue periférico para análise do nível sérico de Lp(a), obedecendo os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- Doentes maiores de 18 anos;
- Ausência de lesões compatíveis com VL em atividade ou pregressa ou lesões cutâneas compatíveis com vasculite.

Critérios de exclusão:

- Idade inferior a 18 anos;
- Gestantes;
- Impossibilidade de submeter-se aos exames complementares solicitados (coleta de sangue, biópsia da pele acometida e ultra-sonografia doppler venoso e arterial dos membros inferiores).
- Pele acometida por células tumorais ou processo inflamatório
- Co-morbidades como:
  - Doença dislipidêmica conhecida
  - Doença autoimune do tecido conectivo
  - Doença inflamatória sistêmica aguda
  - Insuficiência renal
  - Insuficiência hepática
  - Diabetes melito
  - Psoríase

- Vasculites
- Uso de drogas redutoras de lípides, imunossupressores, ácido nicotínico, ácido acetil-salicílico, danazol ou estanazolol.

Todo o inventário clínico destes dois grupos, bem como dados laboratoriais e estudos de imagem foram solicitados e posteriormente catalogados através de revisão sistemática de prontuários.

3.2 Métodos

A fim de se caracterizar a associação da VL com outras condições tradicionalmente relatadas na literatura, etiopatogenicamente a ela relacionadas foram obtidas amostras sanguíneas dos pacientes com VL para a investigação de marcadores imunológicos, inflamatórios, bioquímicos e de coagulação que foram encaminhadas para análise nos laboratórios central do HC-FMUSP, Laboratório de Investigação Médica (LIM17) da Disciplina de Reumatologia e Laboratório do Instituto do Coração (InCor). Serão pesquisados os auto-anticorpos: FAN, anticardiolipina (IgM e IgG), anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA); componentes e atividade do sistema complemento (C3, C4 e CH50), crioglobulinas, fator reumatoide (Látex e Waaler-Rose) e anticoagulante lúpico.

Outros exames a serem solicitados: hemograma completo, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, gamaglutamil transferase (GGT), sorologias para os vírus da hepatite B, hepatite C e vírus da imunodeficiência humana (HIV) e dosagem da Lp(a).

Dentre os auto-anticorpos e provas inflamatórias pesquisados estão:

Os **anticorpos contra antígenos celulares, como o fator antinuclear (FAN)** foram pesquisados através da técnica de imunofluorescência indireta, utilizando *imprint* de fígado de camundongo e células HEp2 (PAAC-HEp-2) como substratos. Foram utilizadas ambas as fontes antigênicas para todos os pacientes, conforme estabelecido na rotina do Laboratório do nosso Serviço. Foram considerados resultados positivos aqueles acima de 1:80. Todos os soros foram testados em metodologia padronizada no nosso laboratório e os resultados confirmados também em kit comercial (Euroimmun, Lubeck, Alemanha)¹²⁹.

Os **anticorpos anticardiolipina (aCL IgM e IgG)** foram detectados por ELISA¹³⁰. Resumidamente, orifícios de placas de poliestireno foram sensibilizados com a cardiolipina (Sigma Chem. Co., EUA), na concentração de 50µg/mL em etanol gelado (50µg/orifício), por 16 horas a 4°C. Após lavagem, a placa foi bloqueada por duas horas com soro fetal bovino inativado (56°C por 30 minutos) a 30% em PBS. Os orifícios foram sequencialmente incubados, em duplicata, com os soros diluídos 1:50 e IgG de cabra anti-IgG ou anti-IgM humanas, marcadas com peroxidase (Sigma Chem. Co., EUA). Os resultados foram expressos em unidades GPL e MPL, determinadas por meio de curva construída a partir dos valores de densidade óptica obtidos de amostras de soros.

O **anticoagulante lúpico (ACL)** foi realizado por meio de testes hematológicos funcionais inicialmente pelo teste de rastreamento com o TTPa e, em seguida, o teste do veneno da víbora de Russel (dRVVT) nos casos em

que o TTPa for negativo. Nos casos onde a razão entre o TTPa do paciente e do controle normal, foi maior que 1,2, foram realizados a prova de mistura de 50% de plasma normal com 50% do plasma-teste, nos casos onde houve correção do TTPa ou dRVVT, foi diagnosticado deficiência de fator de coagulação. Caso contrário, se não houve correção e esta fora obtida com a mistura com plasma rico em fosfolípidos (plaquetas), fora diagnosticado o ACL. Este teste foi realizado tendo-se o cuidado de verificar se o INR do tempo de protrombina era menor que 3,5, no caso de maior que este valor uma pré-mistura com plasma normal fora realizada antes de se proceder ao TTPa¹³⁰.

A detecção de **anticorpos anticitoplasma de neutrófilos** foi realizada através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se neutrófilos humanos como substrato. ELISA para anti-proteinase 3 e mieloperoxidase foi realizada nos resultados positivos deste anticorpo para checar a especificidade do anticorpo.

A detecção de **fator reumatoide** foi realizada pelas técnicas de partículas cobertas de látex e pela técnica de Waaler-Rose.

A avaliação da **atividade do complemento (CH100)** nos soros foi estimada pelo método da lise de eritrócitos sensibilizados com hemolisina na dose subaglutinante incorporados a um gel de agarose. O limite dos valores normais era de 150 a 350 U/ml. As **frações do complemento (C3 e C4)** foram quantificadas por imunodifusão radial utilizando placas contendo anticorpos monoespecíficos dispersos homogeneamente em agarose (Behring, Alemanha). Os valores normais estabelecidos pelo fabricante são: C3 = 55-120 mg% e C4 = 20-50 mg%¹³¹.

Avaliação da presença de trombofilias hereditárias e adquiridas foi realizada pelos seguintes exames disponíveis no Laboratório Central do HC-FMUSP ou no LIM-17 do HC-FMUSP:

- Determinação do **tempo de protrombina** pelo método de Quick modificado [valor de referência (VR): atividade de protrombina > 70%; INR 0,95-1,20];
- Determinação do **tempo de tromboplastina parcial ativada** pelo método Proctor e Rapaport modificado (VR: 0,80-1,20);
- Dosagem da **atividade da antitrombina** pelo método cromogênico (VR: 60-120%);
- Dosagem da **proteína C** pelo método cromogênico (VR: 65-145%);
- Dosagem da **proteína S** pelo método cromométrico (VR: 55-150%);
- Dosagem do **fibrinogênio** pelo método Clauss modificado (VR: 150-400 mg/dL);
- Dosagem de **homocisteína** pelo método da quimioluminescência (VR: 5-15 $\mu\text{mol/mL}$).
- Investigação das **mutações/polimorfismos nos genes do fator V (fator V Leiden-G1691A) e da protrombina (G20210A)** será realizada através das reações em cadeia da polimerase (PCR), segundo técnicas descritas a seguir:

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A investigação das mutações nos genes do fator V Leiden (G1691A) e da protrombina (G20210A), fora realizada pela técnica da PCR, seguida de

digestão com endonucleases de restrição para análise dos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), seguindo protocolos previamente otimizados^{132,133}. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Invitrogen®, cujas sequências foram descritas por Huber *et al.* (2000)¹³⁴, para detecção das mutações G1691A (FV) e G20210A (protrombina).

Nas reações de PCR, foram utilizados desoxirribonucleotídeos fornecidos pela GIBCO BRL®, tampão (15 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de Triton-100) e Taq polimerase fornecida pela Phoneutria®.

A lipoproteína(a) [Lp(a)] foi mensurada pela técnica de imunoturbidimetria^{135,136}, através de kit comercial (DiaSorin®, Sallugia, Itália). A calibração do aparelho foi realizada utilizando os calibradores fornecidos pelo kit. Os valores considerados alterados foram aqueles superiores a 30 mg/dL.

Biópsias cutâneas foram obtidas de todos os doentes que aderiram ao estudo e portadores de lesões ativas da VL (ulcerações) e dos sujeitos controles.

A biópsia foi realizada da borda das ulcerações ou mancha púrpura adjacente, através de trépano (punch) de 4 mm de diâmetro, com prévia assepsia com clorhexidine tópico, anestesia com lidocaína 2% sem vasoconstritor e sutura com fio mononylon 4.0 (Ethicon®, 3M, Brasil), representando a epiderme, derme e hipoderme.

Dos nove sujeitos controles para amostra de pele, três eram voluntários e foram submetidos a biópsias em áreas de pele normal nos

membros inferiores. Pele excedente dos outros seis doentes foram obtidas durante o procedimento para remoção de lesões com indicação de remoção cirúrgica.

As amostras de pele foram submetidas à técnica histológica de rotina com coloração pela HE. Vinte e oito pacientes realizaram imunofluorescência direta através de técnica padrão do laboratório de dermatologia do HC-FMUSP¹³⁷. Todas as amostras de pele de pacientes e amostras dos nove sujeitos controles foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica, para avaliar a expressão tecidual da Lp(a), segundo técnica descrita abaixo.

3.2.1 Técnica de imuno-histoquímica

O ensaio de imuno-histoquímica foi realizado para pesquisar a expressão tecidual de Lp(a) nos pacientes com VL e nos controles. Cortes histológicos de 4 μ m 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%. As secções foram submetidas à reação de imuno-histoquímica utilizando-se o método da estreptavidina ligada à biotina (LSAB) que é uma variante do método avidina-biotina-peroxidase (ABC)¹³⁸ seguindo o protocolo discriminado abaixo:

- **Marcação simples pela imuno-histoquímica:**

1. Desparafinização em dois banhos de xilol de 20 e 10 minutos, respectivamente, a temperatura ambiente.

2. Passagem em etanol 100%, 95%, 80%, 70% por 30 segundos.
3. Lavagem em água corrente por cinco minutos.
4. O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada.
5. Lavagem das lâminas em água corrente durante cinco minutos;
6. Tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido, em panela a vapor, na solução Target Retrieval Solution pH 9,0 (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. 52367), durante 25 minutos, após o aquecimento do tampão a 95°C.
7. Lavagem das lâminas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4.
8. Bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.
9. Incubação com o anticorpo primário monoclonal anti-Lipoproteína (a) (Abcam, cód. Ab109770, Cambridge, UK), na diluição 1:300, em BSA fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS pH 7,4, “overnight” a 4°C.

10. Lavagem das lâminas por duas vezes em tampão PBS pH 7.4 durante cinco minutos cada.
11. Incubação com o anticorpo secundário (Picture-Max, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, cód. 878983), em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.
12. Revelação dos sítios de ligações 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%.
13. Lavagem em água corrente por cinco minutos.
14. Contra-coloração com Hematoxilina de Carazzi por 20 segundos.
15. Lavagem em água corrente por cinco minutos e secagem à temperatura ambiente.
16. Montagem das lâminas com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100) e lamínulas para leitura em microscopia óptica.

Foi realizado a digitalização integral das lâminas utilizando o equipamento PannoramicScan (3DHistech®, Budapeste, Hungria) para obtenção das imagens com objetiva de 40x e visualização e exportação das mesmas, através do software Pannoramic Viewer (3DHistech, Budapeste, Hungria). A quantificação das áreas coradas foi realizada pelo analisador de imagens e software Image-Pro® Plus versão 4.5 para Windows® (Media Cybernetics- Silver Spring MD- USA) instalado em um computador pessoal.

A positividade de cada reação foi determinada por intervalos de cor (“threshold”- limiares). Para definição do limiar de cor, diferentes cortes, bem como controles negativos, foram avaliados para se obter o melhor intervalo de positividade entre estes casos e assim definido o padrão de cor. Este procedimento gerou um arquivo contendo o espectro de cor selecionado e este era, posteriormente, aplicado para todos os casos corados com o mesmo anticorpo¹³⁹.

O programa permite ainda a seleção de uma região onde a medida deva ser realizada, denominada “área de interesse”. Assim, as áreas de interesse, localizadas apenas na derme, foram manualmente determinadas em cada campo e foram medidas as áreas positivamente coradas num aumento de 200 vezes. A área positiva para cada proteína foi corrigida pela área total da amostra de pele (área positiva μm^2 /área total em μm^2) e a área fracionada foi expressa em porcentagem de área positiva.

3.3 Análise Estatística

Foi utilizado o software R (Software R, 3.2.1 versão Viena, Áustria)¹⁴⁰ para realizar a análise estatística. Inicialmente todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade por meio do teste D’Agostino-Pearson. As amostras foram caracterizadas por meio de tabelas de frequência e contingência para as variáveis qualitativas, e de medidas resumo para as variáveis quantitativas. Para avaliar correlação das variáveis idade e gênero e comparar os níveis de Lpa tecidual e sanguínea entre os grupos foi utilizado o *teste não-paramétrico de Mann-Whitney*.

A correlação entre as variáveis foi calculada através do *coeficiente de correlação de Pearson*.

Na etapa inferencial, utilizou-se técnicas de *Modelos Lineares Generalizados* para avaliar a diferença de LPA tecidual de acordo com as co-variáveis de interesse.

Uma probabilidade de erro alfa menor do que 0,05 ($p < 0,05$) foi adotada para definir resultados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Recrutamento dos Pacientes

Do período de janeiro de 2012 à janeiro de 2014 foram recrutados pacientes e controles do ambulatório de dermatologia do HC-FMUSP. Inicialmente foram recrutados 45 pacientes com diagnóstico inicial de VL, porém quatro pacientes tiveram seu diagnóstico modificado durante o seguimento (todos foram diagnosticados como poliarterite nodosa cutânea) e três perderam o seguimento antes de concluir a investigação, restando 38 pacientes. Vinte pacientes foram recrutados como controles de pele, mas 11 foram excluídos, pois não preenchiam os critérios de inclusão. Oitenta controles de sangue foram recrutados, sendo dez excluídos por não preencherem os critérios de inclusão (Figura 13).

Figura 13 - Fluxograma de recrutamento de pacientes e controles

4.2 Caracterização da Amostra

O gênero feminino predominou em todos os grupos, não havendo diferença significativa entre eles. A média de idade dos grupos controles foi significativamente superior ao grupo caso ($p < 0,001$). A cor parda predominou nos grupos caso e controle de pele, não havendo diferença entre eles. Esses dados não foram obtidos do grupo controle de sangue (Tabela 1).

Tabela 1 - Características demográficas de pacientes e controles

Características	Casos	Controles pele	Controles sangue	P*
N (M/F)	38 (11/27)	9 (4/5)	70 (25/45)	0,618
Idade (anos)	37 ± 12,3	55 ± 15,4	51 ± 14,6	<0,001
Raça/Cor (%)				
Branca	39,5	33,3	ND	
Pardo	50,0	55,5	ND	
Negro	7,8	11,1	ND	
Oriental	2,7	0	ND	

M masculino; F feminino; p = significância estatística entre casos e controles de pele. Valores são dados em valores médios ± desvio padrão. ND = não avaliado.

No grupo caso observou-se uma frequência de 36,8% de trombofilias, sendo o mais prevalente, os anticorpos anticardiolipina (20%). Imunofluorescência direta foi avaliada em 73,6% dos casos, sendo positiva em 85,7% dos casos, a maioria para fração C3 do complemento em 67,8%, seguido de IgM em 60,7% (Tabela 2).

Tabela 2 - Achados laboratoriais nos pacientes com vasculopatia livedoide. Frequência de trombofilias, auto-anticorpos e imunofluorescência direta

Achados laboratoriais	Frequência (%)
Mutação do Fator V * (Leiden)	1 (2,85)
Deficiência de Anti-trombina III	1 (2,70)
Mutação do gene da protrombina*	1 (2,85)
Anticorpos anti-cardiolipina	7 (20)
IgM	7 (20)
IgG	4 (11)
Hiperhomocisteinemia	1 (2,6)
Anticoagulante lúpico	1 (2,6)
Fator Reumatoide	N ^a
ANCA [†]	N ^a
FAN [‡]	4 (11)
Imunofluorescência direta na parede dos vasos:	28 (73,6)
IgM	17 (60,7)
IgG	1 (3,5)
IgA	3 (10,7)
C3	19 (67,8)
IgM + C3	13 (46,4)
Total (positivo)	24 (85,7)

*mutação heterozigota; † Anticorpo anticitoplasma de neutrófilo; ‡ Fator antinuclear.
N^a- negativo.

4.3 Morfometria

4.3.1 Análise da Lp(a) tecidual através de imunohistoquímica com anticorpo anti-Lp(a)

Figura 14 - Imunohistoquímica de pacientes com vasculopatia livedoide (casos 11,8, 1 e 5). A coloração com anticorpo anti-Lp(a) em marrom, é intensa em toda epiderme e derme. Na derme a localização é preferencialmente nas áreas de infiltrado inflamatório, em células dérmicas do espaço extracelular adjacente e ao redor dos vasos dérmicos ocluídos. [IHQ (a) e (b) x25; (c) e (d) x50]

Figura 15 - Imunohistoquímica de pacientes com vasculopatia livedoide. O anticorpo anti-Lp(a) depositado ao redor dos vasos e em células dérmicas fusiformes (a); deposição do ac anti-Lp(a) no interior de um vaso ocluído na derme superficial (b). (IHQ, x100 e x200)

Figura 16 - Imunohistoquímica em pele controle. Coloração com anticorpo anti-Lp(a) em peles controle, onde se observa apenas marcação na membrana basal da epiderme. (a), (b) e (c) x25 e (d) x50

Figura 17 - Imunohistoquímica de pacientes e controles. Imunohistoquímica de pacientes com vasculopatia livedoide [(a),(b) e (c), correspondem aos casos 1, 11 e 25] e pacientes controles [(d), (e) e (f) correspondem aos controles 2, 8 e 9]. Note as superfícies epitelizadas nos pacientes com VL e ausência de deposição de Lp(a) na pele sadia dos indivíduos controles. [IHQ x50 em (a), (b) e (c) e IHQ x25 em (d), (e) e (f)]

Os níveis teciduais de Lp(a) no grupo caso foram dez vezes maiores do que no grupo controle, sendo a diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. Nenhuma diferença foi observada entre os gêneros. O gráfico box-plot representa esse achado na Gráfico 1.

Gráfico 1 - Gráfico box-plot de Lp(a) tecidual para grupos e gêneros. O valor médio foi dez vezes maior no grupo caso ($3,036 \pm 1,424$) comparado com o grupo controle ($0,219 \pm 0,245$). O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar as diferenças entre os grupos e gêneros. Diferença significativa foi observada somente entre os grupos doentes e controles

Os valores obtidos a partir da expressão tecidual da Lp(a) não se correlacionaram com nenhuma das variáveis analisadas (idade, gênero e presença de trombofilia).

4.3.2 Análise dos níveis séricos de Lp(a) nos casos e controles

Nível sérico de Lp(a) acima de 30 mg/dL foi observado em 44% dos pacientes com VL, sendo a média do grupo de 39,44 ($\pm$ SD 39,33), não sendo observado diferença estatística com o grupo controle de sangue, com valor médio de 39,55 ($\pm$ SD 34,23). Ver gráfico box-plot para esses achados no Gráfico 2.

Gráfico 2 - O gráfico Box-plot de Lp(a) sanguínea para grupos e gêneros. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar as diferenças entre grupos e gêneros. Não foi observado nenhuma diferença significativa entre grupos e entre gêneros

Na análise de correlação entre as variáveis Lp(a) tecidual e sanguínea, no grupo de pacientes com VL, o teste de correlação de Pearson resultou em 0,02, mostrando ausência de correlação (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Correlação entre Lp(a) tecidual e sanguínea. O coeficiente de correlação de Pearson não mostrou correlação entre a Lp(a) tecidual e a Lp(a) sanguínea, nos pacientes com VL

5 DISCUSSÃO

De forma mais compreensível, propôs-se a discussão dos resultados de forma estruturada e separada, conforme os itens abaixo descritos.

5.1 Lipoprotéina(a) e Expressão Tecidual

Apesar da patogênese da VL ainda não está totalmente esclarecida, distúrbios de coagulação parecem ser o fator causal principal. A Lp(a), uma lipoprotéina conhecida pelo seu potencial trombogênico, vem sendo aventada nos últimos anos, como sendo mais um fator associado a VL. Pesquisou-se a presença da Lp(a) em espécimes de pele não ulceradas, de portadores de VL e em amostras de pele controle e observou-se uma intensa deposição da Lp(a) nas lesões de pele de doentes com VL, sendo *dez vezes maior* que sua expressão na pele controle, o que pode sugerir um provável papel da Lp(a) na indução da trombose observada nos vasos dérmicos na VL.

A presença da Lp(a) na parede de vasos ateroscleróticos, placas ateroscleróticas e aneurismas já foi documentada na literatura por vários autores¹⁴¹⁻¹⁴³, porém pouco se sabe sobre a deposição de Lp(a) em lesões não ateroscleróticas, ou até mesmo na microcirculação cutânea. Etingin *et al.*¹⁴⁴ observou deposição de Lp(a) na parede dos vasos de tecidos inflamados

(fístula de bexiga, cisto pilonidal, amígdalas, linfonodos infartados e pericardite), mas não em tecidos normais e paralelamente, após adição de Lp(a) nas células endoteliais cultivadas, foi observado aumento importante da atividade do PAI-1.

Para Eting *et al.*¹⁴⁴ a interferência da Lp(a) com o PAI-1 promove um *mileu* trombogênico por interferir com a célula endotelial e com a geração de plasmina. Da mesma forma Yano *et al.*¹¹⁸ analisou deposição de Lp(a) em feridas em diferentes estágios de cicatrização, onde se incluíram sete amostras de pele (a localização e etiologia não foram definidas pelos autores) e observaram a deposição de Lp(a) nos estágios iniciais da cicatrização, principalmente na parede dos vasos, nos espaços extracelulares e nas áreas mais superficiais, ricas em fibrina. A marcação nos estágios finais da cicatrização se reduzia e, interessantemente numa mesma amostra tecidual a marcação de Lp(a) era observada apenas nas áreas com infiltrado inflamatório e desepitelizadas, sendo ausente nas áreas epitelizadas e sem infiltrado inflamatório. O nível sérico de Lp(a) não foi avaliado nesses pacientes. Com esses achados os autores concluíram que a Lp(a) estava presente nas feridas com a função de inibir a fibrinólise e facilitar a epitelização da ferida, ou seja, a Lp(a) funcionaria apenas como um reparador tecidual.

Nossas amostras foram obtidas de pele perilesional, portanto todas estavam epitelizadas e diferente do observado por Yano *et al.*¹¹⁸, a marcação da Lp(a) não se deteve a área desepitelizada. As áreas coradas foram semelhantes as observadas pelos autores, ou seja, parede dos vasos, infiltrado perivascular e MEC. Uma pseudo coloração dos epitélios também é descrita e,

provalvemente se deva à ligação da Lp(a) às proteínas da MEC¹¹⁸. Células fusiformes marcadas com o anticorpo anti-Lp(a) na derme, provavelmente são fibroblastos dérmicos ou células dendríticas, os quais sabidamente possuem receptores para Lp(a)¹¹². Interessantemente, acentuada imunomarcagem para Lp(a) foi observada no interior dos vasos dérmicos trombosados, podendo sugerir co-localização com fibrinogênio e corroborando com o papel da Lp(a) como pró-trombótica, como pode ser visualizado na Figura 15.

5.2 Lipoprotéina(a) Sanguínea

Conforme observado em relatos prévios^{5,30,31}, nossos resultados também demonstraram níveis séricos elevados de Lp(a) nos pacientes com VL. Lp(a) maior que 30 mg/dL foi observada em 44% dos pacientes com VL e em 52,8% dos pacientes controles, não havendo portanto, diferença estatisticamente significativa. Vale ressaltar que nosso estudo, até a presente data, constitui o único a envolver um número significativo de doentes portadores de VL e pacientes controles com outras doenças dermatológicas. Em contrapartida, em pacientes com psoríase¹²³ e com aterosclerose coronariana¹⁴⁵ se observa diferença significativa entre os grupos de doentes e controles. Acredita-se que essa discrepância com estudos anteriores, deveu-se a utilização de um maior número de controles (38 doentes com VL *versus* 70 pacientes com outras dermatoses), comparado com as demais publicações, que recrutaram número menor ou igual de controles comparado aos doentes^{143,144}. Um outro ponto importante seria que elevados níveis séricos da Lp(a) estariam funcionando como um

reagente de fase aguda, uma vez que o grupo controle constituiu-se de portadores de dermatoses diversas, as quais podem cursar com elevação de provas de atividade inflamatória.

Papagrigrakis *et al.*¹⁴¹ observou correlação entre nível sérico e nível tecidual em aneurimas de aorta, ele quantificou a Lp(a) após processamento de amostras da parede dos aneurismas e dos trombos, obtendo um coeficiente de correlação significativo, de 0,58. No nosso ponto de vista, o papel da Lp(a) na patogênese da VL é independente do nível sérico. Talvez sua deposição tecidual se deva ao processo de estase venosa frequente entre os doentes com VL, o que localizaria a sua deposição na pele dos pés e pernas pelo ortostatismo e alteração conhecida da função endotelial e permeabilidade capilar nos indivíduos com VL.

5.3 Lipoprotéina(a) x Vasculopatia Livedoide

5.3.1 Alterações imunológicas

A presença de achados de imunofluorescência direta positiva, principalmente para IgM e C3, foi observada em 85,7% dos nossos pacientes, semelhante a achados prévios da literatura^{61,62}. Von Zychlinski *et al.*¹²⁸ identificaram uma associação entre Lp(a) e expressão tecidual de proteínas do sistema complemento através de análise proteômica de amostras de feridas.

Subsequentemente, alguns autores tem sugerido que a Lp(a) possa desencadear uma resposta imune, através da indução de anticorpos e formação de imunocomplexos. A principal associação descrita é com anticorpos antifosfolípide e SAF^{69,116,125-127}. Para a maioria dos autores a

Lp(a) pode explicar os fenômenos trombóticos observados nessas doenças auto-imunes, assim como constituir um marcador de risco para aterosclerose¹¹⁶. Curiosamente, a principal alteração imune detectada nos nossos pacientes foram os anticorpos antifosfolípidos, observados em 20% dos portadores de VL. A relação entre VL e anticorpos antifosfolípide é bem descrita por diversos autores^{69,54,146,147}. É possível que a VL possa se comportar com uma doença autoimune localizada ou mesmo uma doença sistêmica dentro do espectro da SAF.

5.3.2 Distúrbios da fibrinólise

A interação da Lp(a) com o sistema fibrinolítico ocorre através de vários mecanismos, sendo justificada principalmente pela similaridade da Apo(a) com a molécula do plasminogênio. Dessa forma a Lp(a) age inibindo a ativação do plasminogênio, através da inibição do tPA^{23,108}, aumento da expressão do PAI-1 e competição com o plasminogênio nos receptores endoteliais. Agirbasil *et al.*⁵⁸ analisaram o antígeno do PAI-1 e seus níveis de atividade em 20 pacientes com VL e observaram que ambos, o antígeno [34 (26) ng/mL] e a atividade [17 (23) IU/fmol] do PAI-1 estavam elevados no plasma de pacientes com VL comparado aos controles. Nos estudos de cinética do PAI-1 os autores avaliaram um aumento marcante da estabilidade da atividade do PAI-1 no plasma dos pacientes com VL. Os autores não identificaram o mecanismo exato do aumento da estabilidade do PAI-1, sugerindo que poderia ser alguma mutação ou um cofator que se ligaria ao PAI-1. Propõem-se que uma possível interação com a Lp(a),

poderia ser responsável pelo aumento da estabilidade de PAI-1 em pacientes com VL.

A Lp(a), especialmente as formas oxidadas, aumentam a síntese e secreção endotelial e secreção do PAI-1 in vitro, em mais de duas vezes, particularmente para o genótipo 2/2 PAI-1, relacionado a homozigose do promotor do PAI-1 (4G/4G)¹⁴⁸. Deng *et al.*⁴³ descreveram o sucesso do tratamento de um paciente com VL portador da homozigose (4G/4G) com o ativador do plasminogênio tecidual recombinante (r-TPA). Níveis elevados de Lp(a) poderiam acentuar a atividade anti-fibrinolítica nesses pacientes.

5.3.3 Disfunção endotelial

As formas oxidadas da Lp(a) [Lp(a) ox] diminuem a vasodilatação endotélio-dependente de maneira mais acentuada que a LDL oxidada¹⁴⁹. O mecanismo dessa diminuição pode envolver a formação de O₂ e consequentemente a inativação do NO, um importante vasodilatador. Yang *et al.*⁵⁷ realizaram um estudo prospectivo com 16 pacientes com VL em atividade e 16 controles sadios. A vasodilatação fluxo-mediada da artéria braquial foi usada como indicador da função endotelial usando um aparelho de ultrassom bidimensional de alta resolução. Vasodilatação mediada por nitroglicerina não foi significativamente diferente entre os pacientes com VL e os controles, porém a vasodilatação fluxo-mediada foi muito menor nos pacientes com VL comparado com os controles ($3,58 \pm 2,32\%$ vs. $7,51 \pm 2,40\%$, $P < 0,001$). Desafortunadamente, os autores não dosaram os níveis séricos de Lp(a) nesses pacientes, mas na discussão do artigo aventam a

hipótese de algum cofator que possa induzir essa disfunção. Acredita-se que a Lp(a) poderia contribuir com essa disfunção endotelial observada na VL.

5.3.4 Resposta terapêutica

Dois medicamentos utilizados no tratamento da VL estão de alguma forma, relacionados com a Lp(a), os esteroides anabolizantes e o ácido nicotínico. O esteroide anabolizante, danazol, é um andrógeno fraco, com propriedades anabolizantes associadas⁷⁰, com boa resposta terapêutica na VL^{32,69,70}. O danazol diminui drasticamente os níveis séricos de Lp(a), de forma ainda não totalmente esclarecida³². Recentemente, Criado *et al.*³² descreveram quatro casos de VL tratados com danazol e observaram melhora clínica importante com redução dos níveis séricos de Lp(a) em 70%, no primeiro mês do tratamento. O ácido nicotínico reduz os níveis séricos de Lp(a) em até 35-40%³¹ e já foi descrito como opção terapêutica na VL¹². Dessa forma, a Lp(a) seria um possível marcador sérico da resposta terapêutica a esses medicamentos.

Reforça-se a importância desse estudo valioso e inovador, uma vez que é o primeiro estudo a demonstrar a deposição de Lp(a) nas lesões de VL e que apesar da baixa prevalência, a VL é uma doença desafiadora e potencialmente incapacitante afetando principalmente mulheres numa faixa etária de extrema importância para sociedade. Espera-se com esses resultados fornecer novos direcionamentos no estudo da fisiopatogenia da VL e orientar novos tratamentos com alvo na Lp(a).

5.4 Limitações

O fato de necessitarmos de pele aparentemente sã, de doadores submetidos a critérios de exclusão amplos e rígidos, e também por questões médicas de ordem ética, a nossa amostra de controles de pele foi limitada.

Não foram avaliados os critérios de gravidade, além da presença de lesões cutâneas ativas (ulcerações e/ou púrpura) e não foram correlacionados os níveis de Lp(a) com escores de atividade clínica da doença, pela ausência de validação prévia destes critérios de atividade e gravidade disponíveis na literatura publicada à época do estudo, ou seja, no período de coleta das amostras de pele e sangue dos sujeitos envolvidos na pesquisa.

Não foram avaliados os marcadores de atividade inflamatória, como a proteína C reativa, a qual poderia ter sido correlacionada com níveis de Lp(a) em indivíduos casos e controles.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo pode-se observar que:

a) A Lp(a) se deposita na pele, na área perivascular e nos vasos dos pacientes com VL, com significância estatística quando comparado aos controles, e nos conduz a hipótese de que possa atuar de duas formas: (i) induzindo trombose através das suas propriedades pró-coagulante e antifibrinolítica; (ii) na reparação de tecidos induzindo a cicatrização.

b) A Lp(a) não se depositou na pele dos indivíduos controles com significância estatística.

c) Os níveis séricos da Lp(a) demonstraram-se acima dos níveis de risco para doença cardiovascular em 44% dos nossos doentes com VL, porém não diferiu estatisticamente com os níveis de doentes com outras doenças dermatológicas. Isto pode sugerir que, à nível sérico, sua elevação reflita a ação como um reagente de fase aguda frente à doenças tegumentares.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação do protocolo de pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO DIRETORIA CLÍNICA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA - CAPPesq CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA	
Registro (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)	
Nº do Protocolo:	Tipo: Humanos
Instituto: ICHC	
Registro on-line nº: 10416	Data de Entrada: 10/02/2013
Este projeto envolve:	
Pacientes HC .....Sim	
Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa) .....Não	
Documentos HC(Prontuários e Outros) .....Sim	
Materiais estocados no HC .....Sim	
Peças anatômicas de cadáveres .....Não	
1. Título do Protocolo de Pesquisa	
ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS E EXPRESSÃO TECIDUAL CUTÂNEA DA LIPOPROTEÍNA(A) EM DOENTES COM VASCULOPATIA LIVEDÓIDE	

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

vasculite livedóide, úlceras das pernas, lipoproteína(a), estudo imuno-histoquímico

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

A Vasculopatia livedóide (VL) tem vasta sinonímia: livedo vasculite , vasculite hialinizante segmentar , , vasculite livedóide, livedo reticular com úlceras de verão , livedo reticular com úlceras de inverno⁴, atrofia branca de Milian (ABM)^{1,4} e PURPLE (painful purpuric ulcers with reticular pattern of the lower extremities. Do ponto de vista clínico caracteriza-se pela presença de lesões que se iniciam como máculas e/ou pápulas purpúreas, puntiformes ou lenticulares, dolorosas, nos membros inferiores, especialmente nos tornozelos e dorso dos pés, que em seguida geralmente sofrem ulceração, por vezes múltiplas que, individualmente medem em torno de 4 a 6 mm de diâmetro, podendo, porém confluir em grandes úlceras de forma geográfica, as quais cicatrizam lentamente, em torno de 3 a 4 meses , com bordas "estreladas", cor marfínica e centro atrófico, dando o aspecto morfológico da Atrofia Branca (atrophie blanche) . Surgem telangiectasias puntiformes, pigmentação acastanhada de aspecto similar a uma trama reticulada (livedóide) e acompanhados por vezes de verdadeiro livedo racemoso¹. A doença habitualmente instala-se bilateralmente nas pernas, provocando frequentemente edema no terço inferior dos membros. A VL demonstra curso crônico, com exacerbações periódicas e recorrentes. O exame físico pode revelar lesões em diferentes estágios evolutivos. A histopatologia demonstra trombose dos vasos sanguíneos da derme pauci-inflamatória. Tem sido descrita associação com trombofilias herdadas e adquiridas, além de doenças auto-imunes. Os objetivos deste estudo são:a. Estudar os níveis séricos da lipoproteína(a) (Lp-a) em um grupo de pacientes portadores de vasculopatia livedóide (VL), acompanhados no Ambulatório de Vasculites da Divisão

de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e comparando-os com pacientes controles, sem doenças vasculares ou outras doenças dermatológicas associadas a eventos cardiovasculares. b. Verificar a expressão tecidual da lipoproteína a (Lpa) nas lesões cutâneas destes doentes, comparando-a com a expressão na pele de pacientes normais com níveis séricos normais de lipoproteína(a).

4. Pesquisador Responsável:

Paulo Ricardo Criado

<http://lattes.cnpq.br/6060355270823588>

Graduação: 1989 - Faculdade de Medicina do ABC

Vínculo: Outros

Outro tipo de vínculo: comissionado origem IAMSPE eComplexo Hos

5. Pesquisador Executante:

Paulo Ricardo Criado

<http://lattes.cnpq.br/6060355270823588>

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Danielle Priscila Gomes e Souza

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Dermatologia

Disciplina: Dermatologia

LIM: LIM/56 - Lab Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências

8. Existe entidade externa envolvida?

Não

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Não

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Livre-docência

13. Investigação

Retrospectiva e Prospectiva (Ambos)

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Entrevistas e questionários

Prontuários de pacientes

Tecidos, órgãos, fluidos orgânicos

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Clínica

16. Áreas temáticas previstas na Res. 196/96

Nenhuma das alternativas

Anexo B - Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP¹

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : . M ☒ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
 ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
 BAIRRO: ..... CIDADE .....
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2 RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
 ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
 BAIRRO: ..... CIDADE: .....
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE TROMBOFILIAS NA VASCULOPATIA LIVEDÓIDE

PESQUISADOR : PAULO RICARDO CRIADO

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO ASSISTENTE INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº:

UNIDADE DO HCFMUSP: INSTITUTO CENTRAL

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável .....

Rubrica do pesquisador .....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**1 – Desenho do estudo e objetivo(s):**

O objetivo deste estudo é estudar os níveis séricos da Lipoproteína a (Lp-a) num grupo de pacientes portadores de vasculopatia livedóide (VL), acompanhados no Ambulatório de Vasculites da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e correlacionar os achados com os valores obtidos de pacientes que procuram o ambulatório geral da dermatologia (grupo controle), sem doenças cardiovasculares conhecidas.

- Verificar a expressão tecidual na pele dos portadores de VL, da lipoproteína (a) [Lp(a)], através de técnicas de imuno-histoquímica, comparando-a com a expressão desta na pele normal proveniente de doentes submetidos à cirurgia ortopédica nos pés.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Serão obtidas amostras sanguíneas para a investigação de marcadores imunológicos, inflamatórios, bioquímicos e de coagulação em todos os pacientes doentes, o que já se faz de forma rotineira. As mesmas amostras serão obtidas dos pacientes controles, após consentimento livre e esclarecido.

Biópsias cutâneas serão obtidas de todos os doentes que aderiram ao estudo, portadores de lesões ativas (ulcerações) da vasculopatia livedóide. Serão obtidas amostras de pele do pé ou tornozelo de 10 pacientes submetidos a cirurgias reparadoras nos membros inferiores, no Departamento de Ortopedia do HCFMUSP.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados –

Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço;

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

A biópsia será realizada na borda das ulcerações por meio de punch de 4mm de diâmetro, após infiltração anestésica local com xylocaína 2%, seguida de sutura com fio mononylon4.0.³

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:

O paciente poderá sentir um leve desconforto na punção de veia periférica e durante a infiltração anestésica da biópsia.

5 – Benefícios para o participante:

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que outros fatores protrombóticos estejam relacionados etiopatogenicamente com esta doença. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício e atuar no combate e prevenção deste.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não há alternativas para coleta de sangue e biópsia, pelos quais o paciente possa optar.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Paulo Ricardo Criado que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aquiar, 255 - Cerqueira César - 05403-000 / São Paulo - Brasil. Telefone(s) _____

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 de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappelq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

5

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Anexo C - Resultados de exames coletados dos casos e controles

Exames coletados dos pacientes portadores de vasculopatia lúpus

Caso	TTPA	TT	INR	PROTS	PROTC	PLQT	ACL	Homo	C3	C4	FBG	FR	FAN*	Crio	ATrombina III	ANCA	ACDM	ACDG	IgG	C3	IgA	M. PROT	Fator V
1	1,02	16	0,95	120	105	247	N	11,9	127	28	561	N	N	ND	107	N	N	N	N	P	N	N	N
2	1	15	1	50	90	180	N	8	130	20	350	N	N	ND	105	N	ND	ND	ND	ND	N	N	N
3	1		0,95	117	166	311	N	7	149	15,2	280	N	N	N	121	N	N	N	ND	ND	N	N	N
4	1,08	16,4	1,16	0,84	96	264	N	11	120	27	353	N	N	ND	ND	N	N	N	ND	ND	N	N	N
5	0,86		0,97	100	90	327	N	10,2	118	22	381	N	N	ND	102	N	N	N	ND	ND	N	N	N
6	0,89	18,7	0,95	58	65	200	N	11	115	14	279	N	N	ND	85	N	N	N	N	P	N	N	N
7	1	18	0,95	50	146	393	N	8,8	179	41	641	N	N	N	119	N	N	N	N	P	N	N	Heterozigota
8	27,8	13	1,1	70	112	237	N	6	129	17	348	N	N	ND	106	N	N	N	ND	ND	N	N	N
9	0,96	18	0,97	110	119	261	1,4	6,2	149	21	347	N	N	ND	97	N	39	N	P	P	N	N	N
10	1,19	15,2	1,06	120	112	291	N	9,44	112	18	290	N	N	N	87	N	93	N	ND	ND	N	N	ND
11	1,04	17,5	1,04	68	117	280	N	14	ND	ND	326	N	N	ND	107	N	N	N	N	P	N	N	N
12	1,09	16,2	1,14	54	88	270	N	9,9	139	36	279	N	N	N	98	N	N	N	N	P	N	N	N
13	0,8	21,3	0,95	129	152	324	N	7,61	167	33	441	N	N	N	105	N	N	N	N	P	ND	N	ND
14	1,03		0,99	81	94	221	N	7,3	101	20,5	254	N	N	ND	99	N	N	P	P	P	N	N	N
15	0,8	10,3	0,97	53	102	291	N	5,84	109	40	295	N	N	N	89	N	N	N	N	P	N	N	N
16	0,96	16,8	0,95	87	114	232	N	6	177	24	284	N	N	ND	118	N	N	N	N	P	N	N	N
17	0,98	13	1,16	59	91	269	N	5,5	120	19	360	N	N	N	147	N	N	N	N	P	N	N	N
18	1,1	17,6	1	82	135	295	N	8,2	122	28	375	N	N	N	100	N	N	N	N	N	N	N	N
19	1	16,8	1	86	75	283	N	ND	108	25	544	N	N	ND	102	N	25	9	N	P	N	N	N
20	0,9	1,8	0,95	84	147	374	N	6,7	122	23	529	N	1/80	N	61	N	N	N	N	N	N	N	N
21	1,09	17	1,02	80	128	159	N	9,62	ND	ND	295	N	N	ND	110	N	4	41	N	P	N	N	N
22	0,94	0,88	1,03	145	98	285	N	8,43	144	26	360	N	N	N	102	N	N	N	N	P	N	N	N
23	1,2	19,7	1,11	130	96	231	N	7,1	189	25	334	N	1/80	ND	117	N	33	21	N	N	ND	ND	ND
24	0,8		0,95	66	150	288	N	32,7	109	16	289	N	N	ND	127	N	N	N	N	N	N	N	N

Continua

Caso	TTPA	TT	INR	PROTS	PROTC	PLQT	ACL	Homo	C3	C4	FBG	FR	FAN*	Crio	ATrombina III	ANCA	ACDM	ACDG	IgG	IgM	C3	IgA	M.PROT	Fator V
25	1	21	1	57	139	350	N	7,3	134	24	250	N	N	ND	122	N	14	N	ND	ND	ND	ND	N	N
26	0,8	19,1	1	90	98	253	ND	ND	130	48	486	N	ND	N	115	N	11	30	N	P	N	N	N	N
27	1,05	17	1,02	97	110	312	ND	14,1	150	22,7	353	N	N	ND	106	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28	0,97	18,1	1	50	84	320	N	9,2	77	16	304	N	N	N	51	N	N	N	P	P	P	N	N	N
29	1,2	19,3	1,2	58	152	226	N	4,8	123	29	360	N	N	N	103	N	N	N	N	P	P	N	N	N
30	1,21	17,5	1,05	127	86	282	N	7,3	ND	ND	456	N	1/320	ND	87	N	N	N	N	P	P	N	N	N
31	1,1	18,7	1,1	145	101	228	N	14,1	20	120	359	N	N	N	90	N	N	N	N	P	N	N	N	N
32	1,18	18	1,03	106	100	245	N	10	132	18,1	353	N	N	ND	82	N	N	N	N	N	N	N	N	N
33	1,38	17,6	1,21	70	95	196	N	14	171	21	385	N	N	N	90	N	ND	ND	ND	ND	ND	N	N	N
34	1	17,7	1,2	113	115	224	N	9,78	125	19	266	N	N	N	103	N	N	N	N	P	P	N	N	N
35	1,12	19	1,01	43	130	388	N	9,1	128	33	317	N	1/80	ND	116	N	N	N	N	P	P	N	N	N
36	0,93	17,8	0,95	60	131	293	N	6,49	102	24	256	N	N	ND	97	N	N	N	ND	ND	ND	Heterozigota	N	N
37	0,98	17,9	1,18	50	68	183	N	4,4	90	19	428	N	N	ND	97	N	N	N	N	N	P	N	N	N
38	1,07	16,9	1,02	60	98	256	N	9,1	121	23,5	337	N	N	N	90	N	N	N	ND	ND	ND	N	N	N

TTPA= tempo de tromboplastina parcial ativada; TP = tempo de protrombina; INR= índice de normalização; PROT S= proteína S; PROTC= proteína C; PLQT= Plaqueta; ACL= anticorpo anticoagulante lúpico; HOMO= homocisteína sérica; C3 E C4= frações 3 e 4 do complemento; FBG= fibrinogênio; FR= fator reumatoide; FAN= fator antinuclear; Crio= crioglobulina sérica; ATROMBINA III= atividade de antitrombina III; ANCA= anticorpo anti citoplasma de neutrófilo; ACDM E ACDG = anticorpo anticardiolipina IgM e IgG; IgM, IgG, C3 e IgA= resultados da imunofluorescência direta da pele; M PROT= mutação da protrombina; Fator V= mutação do fator V- Leiden; N = Negativo; ND = Não disponível

Dados demográficos e níveis de lipoproteína (a) sanguínea e tecidual dos pacientes com vasculopatia livedoide

Caso	Idade	Gênero	Etnia	Lp(a) (mg/dL)	Lp(a) tecido
1	41	M	Pardo	7	1,1
2	34	F	Branco	7	2,88
3	37	F	Pardo	7	2,5
4	28	F	Branco	7	3,4
5	27	M	Branco	7	4,7
6	22	F	Pardo	7	2,9
7	55	F	Pardo	7	2,63
8	39	F	Pardo	9	1,48
9	35	F	Pardo	9	2,6
10	30	M	Pardo	10	3,26
11	47	M	Pardo	11	3,8
12	28	F	Pardo	13	3,1
13	55	F	Pardo	13,8	2,38
14	26	F	Pardo	17	3,2
15	53	F	Pardo	19	4,6
16	25	M	Pardo	19	4,3
17	51	F	Branco	20	2,97
18	48	F	Branco	22	3
19	61	F	Pardo	22	1,66
20	34	F	Pardo	24	2,08
21	25	M	Pardo	26	2,3
22	49	F	Pardo	33	6,3
23	39	F	Negro	34	3,38
24	35	F	Pardo	41	3,8
25	40	F	Negro	42	6,2
26	60	F	Pardo	46	1,76
27	24	M	Pardo	48	1,4
28	33	F	Branco	51	2,64
29	23	F	Pardo	57	3,4
30	15	F	Branco	58	1,66
31	50	M	Pardo	65	6,7
32	16	M	Pardo	68	0,82
33	55	M	Pardo	75	1,36
34	44	F	Negro	83	4
35	40	M	Pardo	83	2,6
36	46	F	Pardo	106	0,96
37	27	F	Negro	155	4,58
38	32	F	Pardo	170	2,95

LM: masculino; F: feminino. Valores em vermelhos são os considerados positivos [Lp(a) > 30mg/dL]

Dados demográficos e níveis sanguíneos e teciduais de lipoproteína (a) nos controles de pele sadia

Controle	Etnia	Gênero	Idade	Lp(a) (mgdL)	Lp(a) tecido
1	Pardo	F	53	84	0,1
2	Pardo	M	66	75	0,3
3	Branca	F	63	7	0,01
4	Pardo	M	25	7	0,06
5	Branco	M	68	7	0,8
6	Branco	M	60	7	0,09
7	Pardo	F	59	7	0,35
8	Negro	F	44	44	0,18
9	Parda	F	61	37	0,08

M: masculino; F: feminino.

Dados demográficos e níveis sanguíneos de lipoproteína (a) nos controles de sangue periférico

Controles Sangue	Idade	Sexo	Cor	Doença	Lp(a)
1	59	F	B	Dermatite atópica	7
2	29	M	P	Erupção medicamentosa	18
3	42	M	P	Hanseníase	30
4	40	M	P	Eumicetoma	12
5	58	M	B	Onicomicose	40
6	24	F	M	Paracoccidioidomicose	38
7	73	F	B	Leishmaniose	92
8	48	F	B	Rosácea	7
9	47	M	B	Cromomicose	58
10	48	F	M	Urticária	18
11	61	F	B	Dermatomiosite	7
12	24	F	B	Eczema de estase	11
13	50	M	P	Psoríase eritrodermica	10
14	29	F	B	Erupção medicamentosa	13
15	63	F	B	Penfigoide bolhoso; vitiligo	7
16	62	F	B	Púrpura pigmentosa crônica	7
17	54	M	B	Erupção medicamentosa	7
18	80	F	B	Eczema	7
19	75	F	B	Cromomicose	97
20	33	M	ND	Urticária	19
21	54	F	ND	Nevo congênito	31
22	52	M	ND	Urticária	7
23	70	M	ND	Eczema	120
24	53	F	ND	Nevo rubi	84
25	66	M	ND	Carcinoma basocelular	75
26	63	F	ND	Carcinoma espinocelular	7
27	25	M	ND	Neurofibroma	7
28	68	M	ND	Carcinoma de Merkel	7
29	60	M	ND	Voluntário sadio	7
30	59	F	ND	Voluntário sadio	7
31	44	F	ND	Voluntário sadio	44
32	61	F	ND	Carcinoma espinocelular	37
33	33	F	B	Urticária	9
34	43	F	N	Urticária	22

Continua

Controles Sangue	Idade	Sexo	Cor	Doença	Conclusão
					Lp(a)
35	37	F	B	Urticária	57
36	58	F	N	Urticária	27
37	32	F	B	Esporotricose	75
38	72	M	B	Esporotricose	84
39	49	M	B	Eumicetoma	90
40	34	M	B	Psoríase	42
41	58	F	B	Urticária crônica	32
42	30	F	B	Urticária crônica	7
43	72	F	N	Urticária crônica	32
44	50	F	B	Urticária crônica	7
45	44	F	B	Lúpus discoide	98
46	66	M	N	Paracoccidioidomicose	72
47	57	F	B	Tinea pedis	39
48	52	M	B	Paracoccidioidomicose	7
49	64	M	B	Paracoccidioidomicose	7
50	32	M	B	Paracoccidioidomicose	7
51	33	F	B	Urticaria crônica	63
52	58	M	B	Eritrodermia	133
53	47	F	B	Urticaria crônica	80
54	53	M	B	Urticaria cronica + vitiligo	79
55	56	F	N	Urticaria crônica	44
56	47	F	B	Urticária crônica	53
57	44	F	B	Alopécia areata	78
58	42	F	B	Alopécia androgenética	16
59	57	F	B	Alopécia areata	63
60	54	F	B	Alopécia areata	18
61	69	F	B	Alopécia frontal fibrosante	28
62	68	F	B	Alopécia frontal fibrosante	58
63	55	M	N	Alopécia areata	47
64	67	F	B	Alopécia androgenética	44
65	59	F	B	Alopecia androgenética	137
66	29	F	N	Alopécia de tração	7
67	18	F	B	Alopécia andrognética	34
68	56	F	B	Alopécia androgenética	14
69	71	M	B	Eczema	44
70	70	F	B	Leishmaniose	77

M: masculino; F: feminino; B: branco; P: Pardo; N: negro; ND: não disponível.

8 REFERÊNCIAS

1. Bard JW, Winkelmann RK. Livedo vasculitis: segmental hyalinizing vasculitis of the dermis. *Arch Dermatol*. 1967; 96(5):489-99.
2. Criado PR, Rivitti EA, Sotto MN, de Carvalho JF. Livedoid vasculopathy as a coagulation disorder. *Autoimmun Rev*. 2011; 10(6):353-60.
3. Papi M, Didona B, De Pità O, Frezzolini A, Di Giulio s, De Matteis W, Del Principe D, Cavalieri R. Livedo vasculopathy vs small vessel cutaneous vasculitis: cytokine and platelet P-selectin studies. *Arch Dermatol*. 1998; 134(4):447-52.
4. Feldaker M, Hines EA, Kierland RR. Livedo reticularis with summer ulcerations. *Arch Dermatol*. 1955; 72(1):31-42.
5. Goerge T, Weishaupt C, Metze D, Nowak-Göttl U, Sunderkötter C, Steinhoff M, Schneider SW. Livedoid vasculopathy in a pediatric patient with elevated lipoprotein(a) levels: prompt response to continuous low-molecular-weight heparin. *Arch Dermatol*. 2010; 146(8):927-8.
6. Poletti ED, Muñoz Sandoval NR, Moreno González JL, Santacruz Torres A. Vasculopatía livedoide: significado actual. Comunicación de dos casos. *Dermatología Rev Mex*. 2008; 52(4):175-81.

7. Stevanovic DV. Atrophie blanche: a sign of dermal blood occlusion. *Arch Dermatol*. 1974; 109(6):858-62.
8. Gascon MRP, Carvalho JF, Espinel DPS, Barros AM, Alavi A, Criado PR. Quality-of-life impairment in patients with livedoid vasculopathy. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 71(5):1024-6.
9. Toth C, Trotter M, Clark A, Zochodne D. Mononeuropathy multiplex in association with livedoid vasculitis. *Muscle Nerve*. 2003; 28(5):634-9.
10. Di Giacomo TB, Hussein TP, Souza DG, Criado PR. Frequency of thrombophilia determinant factors in patients with livedoid vasculopathy and treatment with anticoagulant drugs - a prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010; 24(11):1340-6.
11. Jorge AD, Fantini BC, Rivitti EA, Benabou JE, Vasconcellos C, Criado PR. Análise da frequência de trombofilia em pacientes com atrofia branca de Milian. *An Bras Dermatol*. 2007; 82(1):25-33.
12. Winkelmann RK, Schroeter AL, Kierland RR, Ryan TM. Clinical studies of livedoid vasculitis (segmental hyalinizing vasculitis). *Mayo Clin Proc*. 1974; 49(10):746-50.
13. Alavi A, Hafner J, Dutz JP, Mayer D, Sibbald RG, Criado PR, Senet P, Callen JP, Phillips TJ, Romanelli M, Kirsner RS. Livedoid vasculopathy: an in-depth analysis using a modified Delphi approach. *J Am Acad Dermatol*. 2013; 69(6):1033-42.

14. Gan EY, Tang MB, Tan SH, Chua SH, Tan AW. A ten-year retrospective study on livedo vasculopathy in Asian patients. *Ann Acad Med Singapore*. 2012; 41(9):400-6.
15. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Pathologic basis of disease*. 5^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders;1994. p.105-6.
16. Browing CE, Callen JP. Warfarin therapy for livedoid vasculopathy associated with cryofibrinogenemia and hyperhomocysteinemia. *Arch Dermatol*. 2006; 142(6):75-8.
17. Cocuroccia B, Tonanzi T, Menaguale G, Fazio M, Girolomoni G. Livedoid vasculopathy and skin ulcers in patients with inherited thrombophilia. *Eur J Dermatol*. 2002; 12(4):360-3.
18. Gibson GE, Li H, Pittelkow MR. Homocysteinemia and livedoid vasculitis. *J Am Acad Dermatol*. 1999; 40(Pt1):279-81.
19. Oh YB, Jun JB, Kim CK, Lee CW, Park CK, Kim TY, Yoo DH, Kim SY. Mixed connective tissue disease associated with skin defects of livedoid vasculitis. *Clin Rheumatol*. 2000; 19(5):381-4.
20. Chen KR, Toyohara A, Suzuki A, Miyakawa S. Clinical and histopathological spectrum of cutaneous vasculitis in rheumatoid arthritis. *Br J Dermatol*. 2002; 147(5):905-13.
21. Maessen-Visch MB, Koedam MI, Hamulyák K, Neumann HA. Atrophie blanche. *Int J Dermatol*. 1999; 38(3):161-72.

22. Franco RF. Trombofilias hereditarias. *Medicina (Ribeirao Preto)*. 2001; 34:248-57.
23. Anglés-Cano E, de la Peña Díaz A, Loyau S. Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein (a). *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 936:261-75.
24. Biedermann T, Flaig MJ, Sander CA. Livedoid vasculopathy in a patient with factor V mutation (Leiden). *J Cutan Pathol*. 2000; 27(8):410-2.
25. Hairston BR, Davis MD, Pittelkow MR, Ahmed I. Livedoid vasculopathy: further evidence for procoagulant pathogenesis. *Arch Dermatol*. 2006; 142(11):1413-8.
26. Gotlib J, Kohler S, Reicherter P, Oro AE, Zehnder JL. Heterozygous prothrombin G20210A gene mutation in a patient with livedoid vasculitis. *Arch Dermatol*. 2003; 139(8):1081-3.
27. Khenifer S, Thomas L, Balme B, Dalle S. Livedoid vasculitis associated with a double heterozygous Factor V Leiden and prothrombin G20210A gene mutations. *Clin Exp Dermatol*. 2009; 34(8):e811-3.
28. Hegemann B, Helmbold P, Marsch WC. Livedoid vasculitis with ulcerations: the role of antithrombin III deficiency and its therapeutic consequences. *Arch Dermatol*. 2002; 138(6):841-2.
29. Tran MD, Bécherel PA, Cordel N, Piette JC, Francès C. "Idiopathic" white atrophy. *Ann Dermatol Venereol*. 200; 128(10 Pt 1):1003-7.

30. Vasconcelos R, PR Criado, Belda Jr W. Livedoid vasculopathy secondary to high levels of lipoprotein(a). *Br J Dermatol*. 2011; 164(5):1107-24.
31. Criado PR, Espinell DP, Barreto P, Di Giacomo TH, Sotto MN. Lipoprotein(a) and livedoid vasculopathy: a new thrombophilic factor? *Med Hypotheses*. 2015; 85(5):670-4.
32. Criado PR, Espinel DPS, Valente NS, Alavi A, Kirsner RS. Livedoid vasculopathy and high levels of lipoprotein (a): response to danazol. *Dermatol Ther*. 2015; 28(4):248-53.
33. Tabata N, Oonami K, Ishibashi M, Yamazaki M. Livedo vasculopathy associated with IgM anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibody. *Acta Derm Venereol*. 2010; 90(3):313-4.
34. Osada S, Kimura Y, Kawana S. Case of livedoid vasculopathy with peripheral neuropathy successfully treated with low-dose warfarin. *J Dermatol*. 2010; 37(1):98-101.
35. Antunes J, Filipe P, André M, Fraga A, Miltenyi G, Marques Gomes M. Livedoid vasculopathy associated with plasminogen activator inhibitor-1 promoter homozygosity (4G/4G) and prothrombin G20210A heterozygosity: response to t-PA therapy. *Acta Derm Venereol*. 2010; 90(1):91-2.
36. Tsai TF, Yang CH, Chu CY, Liou YH, Hsiao WC, Lin CT, Wu LS. Polymorphisms of MTHFR gene associated with livedoid vasculopathy in Taiwanese population. *J Dermatol Sci*. 2009; 54(3):214-6.

37. Kavala M, Kocaturk E, Zindanci I, Turkoglu Z, Altintas S. A case of livedoid vasculopathy associated with factor V Leiden mutation: successful treatment with oral warfarin. *J Dermatolog Treat.* 2008; 19(2):121-3.
38. Irani-Hakime NA, Stephan F, Kreidy R, Jureidini I, Almawi WY. Livedoid vasculopathy associated with combined prothrombin G20210A and factor V (Leiden) heterozygosity and MTHFR C677T homozygosity. *J Thromb Thrombolysis.* 2008; 26(1):31-4.
39. Davis MD, Wysokinski WE. Ulcerations caused by livedoid vasculopathy associated with a prothrombotic state: Response to warfarin. *J Am Acad Dermatol.* 2008; 58(3):512-5.
40. Anavekar NS, Kelly R. Heterozygous prothrombin gene mutation associated with livedoid vasculopathy. *Australas J Dermatol.* 2007; 48(2):120-3.
41. Kawakami T, Kawasaki K, Mizoguchi M, Soma Y. Therapeutic effect of lipoprostaglandin E1 on livedoid vasculitis associated with essential cryoglobulinaemia. *Br J Dermatol.* 2007; 157(5):1051-3.
42. Cardoso R, Gonçalo M, Tellechea O, Maia R, Borges C, Silva JA, Figueiredo A. Livedoid vasculopathy and hypercoagulability in a patient with primary Sjögren's syndrome. *Int J Dermatol.* 2007; 46(4):431-4.

43. Deng A, Gocke CD, Hess J, Heyman M, Paltiel M, Gaspari A. Livedoid vasculopathy associated with plasminogen activator inhibitor-1 promoter homozygosity (4G/4G) treated successfully with tissue plasminogen activator. *Arch Dermatol*. 2006; 142(11):1466-9.
44. Rampf J, Sunderkötter C, Hirschfeld G, Scharffetter-Kochanek K, Weiss JM. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with moderate hyperhomocysteinaemia in a patient with livedo vasculopathy: treatment with vitamin supplementation and low molecular weight heparin. *Br J Dermatol*. 2006; 155(4):850-2.
45. Amato L, Chiarini C, Berti S, Massi D, Fabbri P. Idiopathic atrophie blanche. *Skinmed*. 2006; 5(3):151-4.
46. Meiss F, Marsch WC, Fischer M. Livedoid vasculopathy. The role of hyperhomocysteinemia and its simple therapeutic consequences. *Eur J Dermatol*. 2006; 16(2):159-62.
47. Juan WH, Chan YS, Lee JC, Yang LC, Hong HS, Yang CH. Livedoid vasculopathy: long-term follow-up results following hyperbaric oxygen therapy. *Br J Dermatol*. 2006; 154(2):251-5.
48. Lewerenz V, Burchardt T, Büchau A, Ruzicka T, Megahed M. Livedoid vasculopathy with heterozygous factor V Leiden mutation and sticky platelet syndrome. *Hautarzt*. 2004; 55(4):379-81.
49. Hairston BR, Davis MD, Gibson LE, Drage LA. Treatment of livedoid vasculopathy with low-molecular-weight heparin: report of 2 cases. *Arch Dermatol*. 2003; 139(8):987-90.

50. Calamia KT, Balabanova M, Perniciaro C, Walsh JS. Livedo (livedoid) vasculitis and the factor V Leiden mutation: additional evidence for abnormal coagulation. *J Am Acad Dermatol*. 2002; 46(1):133-7.
51. Magy N, Algros MP, Racadot E, Gil H, Kantelip B, Dupond JL. Livedoid vasculopathy with combined thrombophilia: efficacy of iloprost. *Rev Med Interne*. 2002; 23(6):554-7.
52. Boyvat A, Kundakçi N, Babikir MOA, Gürgey E. Livedoid vasculopathy associated with heterozygous protein C deficiency. *Br J Dermatol*. 2000; 143(4):840-2.
53. Grasland A, Crickx B, Blanc M, Pouchot J, Vinceneux P. Livedoid vasculopathy (white atrophy) associated with anticardiolipin antibodies. *Ann Med Interne (Paris)*. 2000; 151(5):408-10.
54. Acland KM, Darvay A, Wakelin SH, Russell-Jones R. Livedoid vasculitis: a manifestation of the antiphospholipid syndrome? *Br J Dermatol*. 1999; 140(1):131-5.
55. Klein KL, Pittelkow MR. Tissue plasminogen activator for treatment of livedoid vasculitis. *Mayo Clin Proc*. 1992; 67(10):923-33.
56. Pizzo SV, Murray JC, Gonias SL. Atrophie blanche. A disorder associated with defective release of tissue plasminogen activator. *Arch Pathol Lab Med*. 1986; 110(6):517-9.

-
57. Yang CH, Shen SC, Hui RC, Huang YH, Chu PH, Ho WJ. Association between peripheral vascular endothelial dysfunction and livedoid vasculopathy. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 67(1):107-12.
  58. Agirbasli M, Eren M, Eren F, Murphy SB, Serdar ZA, Seckin D, Zara T, Cem Mat M, Demirkesen C, Vaughan DE. Enhanced functional stability of plasminogen activator inhibitor-1 in patients with livedoid vasculopathy. *J Thrombolysis*. 2011; 32(1):59-63.
  59. McCalmont CS, McCalmont TH, Jorizzo JL, White WL, Leshin B, Rothberger H. Livedo vasculitis: vasculitis or thrombotic vasculopathy? *Clin Exp Dermatol*. 1992; 17(1):4-8.
  60. Hesse G, Kutzner H. Therapeutic use of low molecular weight heparin for capillaritis alba. *Phlebologie*. 2008; 37(21):259-65.
  61. Hisao PF, Wu YH. Distinct pattern of direct immunofluorescence in livedoid vasculopathy. *Am J Dermatopathol*. 2010; 32(3):240-3.
  62. Criado PR, Di Giacomo TH, Souza DP, Santos DV, Aoki V. Direct immunofluorescence findings and thrombophilic factors in livedoid vasculopathy: how do they correlate? *Clin Exp Dermatol*. 2014; 39(1):66-8.
  63. Yang LJ, Chan HL, Chen SY, Kuan YZ, Chen MJ, Wang CN, Kuo TT. Atrophie blanche: a clinicopathological study of 27 patients. *Chang Gung Med J*. 1991; 14(4):237-45.

-
64. Mimouni D et al. Cutaneous polyarteritis nodosa in patients presenting with atrophie blanche. *Br J Dermatol*. 2003; 148(4):789-94.
  65. Monshi B, Posch C, Vujic I, Sesti A, Sobotka S, Rappersberger K. Efficacy of intravenous immunoglobulins in livedoid vasculopathy: Long-term follow-up of 11 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 71(4):738-44.
  66. Woo KY, Sibbald RG. Chronic wound pain: a conceptual model. *Adv Skin Wound Care*. 2008; 21(4):175-88.
  67. Fairfax AJ, Ibbotson RM. Effect of danazol on the biochemical abnormality of inherited antithrombin III deficiency. *Thorax*. 1985; 40(9):646-50.
  68. Crook D, Sidhu M, Seed M, O'Donnell M, Stevenson JC. Lipoprotein a levels are reduced by danazol, an anabolic steroid. *Atherosclerosis*. 1992; 92(1):41-7.
  69. Wakelin SH, Ellis JP, Black MM. Livedoid vasculitis with anticardiolipin antibodies: improvement with danazol. *Br J Dermatol*. 1998; 139(5):935-7.
  70. Hsiao GH, Chiu HC. Livedoid vasculitis. Response to low-dose danazol. *Arch Dermatol*. 1996; 132(7):749-51.
  71. Drucker CR, Duncan WC. Antiplatelet therapy in atrophie blanche and livedo vasculitis. *J Am Acad Dermatol*. 1982; 7(3):359-63.
  72. Lee SS, Ang P, Tan SH. Clinical profile and treatment outcome of livedo vasculitis: a case series. *Ann Acad Med Singapore*. 2003; 32(6):835-9.

73. Purcell SM, Hayes TJ. Nifedipine treatment of idiopathic atrophie blanche. *J Am Acad Dermatol*. 1986; 14(5 Pt 1):851-4.
74. Sams WM Jr. Livedo vasculitis: therapy with pentoxifylline. *Arch Dermatol*. 1988; 124(5):684-7.
75. Lee JH, Choi HJ, Kim SM, Hann SK, Park YK. Livedoid vasculitis responding to PUVA therapy. *Int J Dermatol*. 2001; 40(2):153-7.
76. Choi HJ, Hann SK. Livedo reticularis and livedoid vasculitis responding to PUVA therapy. *J Am Acad Dermatol*. 1999; 40(2 Pt 1):204-7.
77. Tuchinda C, Leenutaphong V, Sudtim S, Lim HW. Refractory livedoid vasculitis responding to PUVA: a report of four cases. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005; 21(3):154-6.
78. Ravat FE, Evans AV, Russell-Jones R. Response of livedoid vasculitis to intravenous immunoglobulin. *Br J Dermatol*. 2002; 147(1):166-9.
79. Kreuter A, Gambichler T, Breuckmann F, Bechara FG, Rotterdam S, Stücker M, Altemeyer P. Pulsed intravenous immunoglobulin therapy in livedoid vasculitis: an open trial evaluating 9 consecutive patients. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 51(4):574-9.
80. Sobral Filho JF, Valdek COM, Rodrigues LTD. Tratamento de vasculopatia liveóide com imunoglobulina intravenosa. *An Bras Dermatol*. 2008; 83(4):372-74.

81. Leclerc A, Braeken C, Marot L, Tennstedt D, Lachapelle M. La vasculite livédoïde. Traitement par ciclosporine: A propos de cinq cas. *Lés Nouvelles Dermatologiques*. 2000; 19(4):356-60.
82. Yang CH, Ho HC, Chan YS, Liou LB, Hong HS, Yang LC. Intractable livedoid vasculopathy successfully treated with hyperbaric oxygen. *Br J Dermatol*. 2003; 149(3):647-52.
83. Hölschermann H, Dürfeld F, Maus U, Bierhaus A, Heidinger K, Lohmeyer J, Nawroth PP, Tillmanns H, Haberbosch W. Cyclosporine a inhibits tissue factor expression in monocytes/macrophages. *Blood*. 1996; 88(10):3837-45.
84. Fernandes TD. Hyperbaric medicine. *Acta Med Port*. 2009; 22(4):323-34.
85. Criado PR, Rivitti EA, Vasconcellos C, Valente NYS, Costa Martins JE. Manifestações Cutâneas das Trombofilias. *An Bras Dermatol*. 2008; 83(6):491-506.
86. Su WPD, Winkelmann RK. Livedoid vasculitis. In: *Vasculitis*. Philadelphia: WB Saunders; 1980. p. 297-306.
87. Francès C, Barete S. Difficult management of livedoid vasculopathy. *Arch Dermatol*. 2004; 140(8):1011.
88. Heine KG, Davis GW. Idiopathic atrophie blanche: treatment with low-dose heparin. *Arch Dermatol*. 1986; 122(8):855-6.
89. Jetton RL, Lazarus GS. Minidose heparin therapy for vasculitis of atrophie blanche. *J Am Acad Dermatol*. 1983; 8(1):23-6.

-
90. Merli GJ, Groce JB. Pharmacological and clinical differences between low-molecular-weight heparins: implications for prescribing practice and therapeutic interchange. *P T*. 2010; 35(2):95-105.
  91. Hirsh J, Bauer KA, Donati MB, Gould M, Samama MM, Weitz JI; American College of Chest Physicians. Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008; 133(6 Suppl):141S-159S.
  92. Stevenson JL, Choi SH, Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins - correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(19 Pt 1):7003-11.
  93. Feng W, Wu K, Liu Z, Kong G, Deng Z, Chen S, Wu Y, Chen M, Liu S, Wang H. Oral direct factor Xa inhibitor versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip or knee arthroplasty: Systemic review, traditional meta-analysis, dose-response meta-analysis and network meta-analysis. *Thromb Res*. 2015; 136(6):1133-44.
  94. Eriksson BI, Borris LC, Friedman RJ, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, Bandel TJ, Beckmann H, Muehlhofer E, Misselwitz F, Geerts W; RECORD1 Study Group. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. *N Engl J Med*. 2008; 358(26):2765-75.
  95. Kerk N, Drabik A, Luger TA, Schneider SW, George T. Rivaroxaban prevents painful cutaneous infarctions in livedoid vasculopathy. *Br J Dermatology*. 2013; 168(4):898-9.

-
96. Winchester DS, Drage LA, Davis MD. Response of livedoid vasculopathy to rivaroxaban. *Br J Dermatol*. 2015; 172(4):1148-50.
  97. Evans JM, Jensen JD, Sami N. Successful treatment of livedoid vasculopathy with rivaroxaban. *JAAD*. 2015; 1(6):340-1.
  98. Lee JM, Kim IH. Case series of recalcitrant livedoid vasculopathy treated with rivaroxaban. *Clin Exp Dermatol*. 2016; 41(5):559-61.
  99. Weishaupt C, Strölin A, Kahle B, Kreuter A, Schneider SW, Gerst J, Eveslage M, Drabik A, Goerge T. Anticoagulation with rivaroxaban for livedoid vasculopathy (RILIVA): a multicentre, single-arm, open-label, phase 2a, proof-of-concept trial. *Lancet Haematol*. 2016; 3(2):72-9.
  100. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003; 196(3):430-43.
  101. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34(12):1508-12.
  102. Vapaataho H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit*. 2001; 7(5):1075-85.
  103. Reinhart C. New locations of intravascular tissue factor. *Hämostaseologie*. 2007; 27(1):55-8.
  104. Riches K, Porter KE. Lipoprotein(a): cellular effects and molecular mechanisms. *Cholesterol*. 2012; 2012:923289.

-
105. Ghiadoni L, Mosca M, Tani C, Viridis A, Taddei S, Bombardieri S. Clinical and methodological aspects of endothelial function in patients with systemic autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26(4):680-7.
106. Bilora F, Satori MT, Zanon E, Campagnolo E, Arzenton M, Rossato A. Flow-mediated arterial dilation in primary antiphospholipid syndrome. *Angiology*. 2009; 60(1):104-7.
107. Gaubatz JW, Heideman C, Gotto AM, Morrisetts JJD, Dahlen GH. Human Plasma Lipoprotein [A]. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983; 258(7):4582-89.
108. Emerging Risk Factors Collaboration, Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio E, Thompson A, White IR, Marcovina SM, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA*. 2009; 302(4):412-23.
109. Ariyo AA, Thach C, Tracy R; Cardiovascular Health Study Investigators. Lp(a) lipoprotein, vascular disease, and mortality in the elderly. *N Engl J Med*. 2003; 349(22):2108-154.
110. Wu JH. Lipoprotein(a) in Vascular Disease, Cancer and Longevity. *Chang Gung Med J*. 2011; 34 (6):555-64.
111. Galvano F, Malaguarnera M, Vacante M, Motta M, Russo C, Malaguarnera G, D'Orazio N, Malaguarnera L. The physiopathology of lipoprotein(a). *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010; 2:866-875.

-
112. Hoover-Plow J, Huang M. Lipoprotein(a) Metabolism: Potential Sites for Therapeutic Targets. *Metabolism*. 2013; 62(4):479-91.
113. Schultz O, Oberhauser F, Saech J, Rubbert-Roth A, Hahn M, Krone W, Laudes M. Effects of inhibition of interleukin-6 signalling on insulin sensitivity and lipoprotein(a) levels in human subjects with rheumatoid diseases. *PLoS One*. 2010; 5:e14328.
114. Kostner KM1, März W, Kostner GM. When should we measure lipoprotein (a)? *Eur Heart J*. 2013; 34(42):3268-76.
115. Romero FI, Khamashta MA, Hughes GRV. Lipoprotein(a) oxidation and autoantibodies: a new path in atherothrombosis. *Lupus*. 2000; 9(3):206-9.
116. Missala I, Kassner U, Steinhagen-Thiessen E. A Systematic Literature Review of the Association of Lipoprotein(a) and Autoimmune Diseases and Atherosclerosis. *Int J Rheumatol*. 2012; 2012:480784.
117. Van der Hoek Y Y, Sangrar W, Cote GP, Kastelein JJP, Koschinsky ML. Binding of recombinant apolipoprotein(a) to extracellular matrix proteins. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14(11):1792-8.
118. Yano Y, Shimokawa K, Okada Y, Noma A. Immunolocalization of lipoprotein(a) in wounded tissues. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45(4):559-68.

119. Siekmeier R, Scharnagl H, Kostner GM, Grammer T, Stojakovic T, März W. Variation of Lp(a) plasma concentrations in health and disease. *Open Clin Chem J.* 2010, 3:72-89.
120. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Genetic evidence that lipoprotein(a) associates with atherosclerosis stenosis rather than venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(7):1732-41.
121. Sofi F, Marcucci R, Abbate R, Gensini GF, Prisco D. Lipoprotein (a) and venous thromboembolism in adults: a meta-analysis. *Am J Med.* 2007; 120(8):728-33.
122. Spence JD, Koschinsky M. Mechanism of lipoprotein(a) pathogenicity: protrombotic, proatherosclerotic, or both? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(7):1550-1151.
123. Pietrzak A, Kadzilewski J, Janowski K, Roliński J, Krasowska D, Chodorowska G, Paszowski T, Kapeć E, Jarstzebska I, Tabarkiewicz J, Lotti T. Lipoprotein (a) in patients with psoriasis: associations with lipid profiles and disease severity. *Int J Dermatol.* 2009; 48(4):379-87.
124. Schroeter AL, Harris RB. The vasculitis of atrophie blanche (livedoide vasculitis) and abdominal aortic pathology. *Cutis.* 1984; 34(3):298-32.
125. Atsumi T, Khamashta MA, Andujar C, Leandro MJ, Amengual O, Ames PR, Hughes GR. Elevated plasma lipoprotein(a) level and its association with impaired fibrinolysis in patients with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1998; 25(1):69-73.

126. Yamazaki M, Asakura H, Jokaji H, Saito M, Uotani C, Komabashiri I, Morishita E, Aoshima K, Ikeda T, Matsuda T. Plasma levels of lipoprotein(a) are elevated in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *Thromb Haemostasis*. 1994; 71(4):424-37.
127. Bećarević M, Singh S, Majkić-Singh N. Lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) in primary antiphospholipid syndrome. *ClinBiochem*. 2007; 40(5-6):317-20.
128. Von Zychlinski A, Kleffmann T, Williams MJ, McCormick SP. Proteomics of Lipoprotein(a) identifies a protein complement associated with response to wounding. *J Proteomics*. 2011; 74(12):2881-91.
129. Dellavance A, Gabriel Jr A, Nucitelli B, et al. *Pesquisa de auto-anticorpos em células HEp-2*. Goiânia: UCG, Goiânia, 2008.
130. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(7):1309-11.
131. Hudson L, Hay FC. Complement. In: Hudson L, Hay FC. 3^a ed. *Practical immunology*. London: Blackwell Scientific Publications, 1989. Cap. 7, p.264-280.

132. Godoi LC. *Avaliação da hemostasia em indivíduos assintomáticos portadores de mutações de importância em trombofilia* [tese]. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 150f.
133. Godoi LC. *Estudo molecular e avaliação da hemostasia em familiares assintomáticos de pacientes portadores de mutação de importância em trombofilia* [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.
134. Huber S, McMaster KJ, Voelkerding KV. Analytical evaluation of primer engineered multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for detection of factor V Leiden and prothrombin G20210A. *J Mol Diagn*. 2000; 2(3):153-7.
135. Burtis C, Aswood e, Bruns D. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular 2^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994.
136. Molinari EA, Pichler PF, Grilhofer H, Kostner GM. Immunoturbidimetric determination of lipoprotein(a): improvement in the measurement of turbid and triglyceride-rich samples. *Clin Chim Acta*. 1995; 235(1):59-69.
137. Flores G, Culton D, Prisayanh P, Qaqish BF, James K, Maldonado M, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. IgG autoantibody response against keratinocyte cadherins in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Invest Dermatol*. 2012; 132(11):2573-80.

-
138. Hsu SM, Raine I, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between abc and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29(4):577-80.
139. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Eliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlían SM, James a, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J.* 2008; 32(1):61-9.
140. R Development Core Team. *R: a language and environment for statistical computing.* Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 30 jul 2015
141. Papagrígorakis E, Iliopoulos D, Asimacopoulos PJ, Safi PJ, Safi HJ, Weilbaecher DJ, Ghazzaly KG, Nava ML, Gaubatz JW, Morrisett JD. Lipoprotein(a) in plasma, arterial wall, and thrombus from patients with aortic aneurysm. *Clin Genet.* 1997; 52(5):262-271.
142. Rath M, Niendorf A, Reblin T, Dietel M, Krebber H-J, Beisiegel U. Detection and quantification of lipoprotein(a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients. *Arteriosclerosis.* 1989; 9(5):579-92.
143. Fortunato JE, Bassiouny HS, Song RH, Kocharian H, Glagov S, Edelstein C, Scanu AM. Apolipoprotein (a) fragments in relation to human carotid plaque instability. *J Vasc Surg.* 2000; 32(3):555-63.

144. Etingin OR, Hajjar DP, Hajjar KA, Harpel PC, Nachman RL. Lipoprotein (a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 1991; 266(4):2459-65.
145. Lima LM, Carvalho Md, Loures-Vale AA, Fernandes AP, Mota AP, Neto CP, Garcia JC, Saad JA, Souza Mde O. Increased serum levels of lipoprotein(a) correlated with the severity of coronary artery disease in patients submitted to angiography. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 87(3):260-6.
146. Weinstein S, Piette W. Cutaneous manifestations of antiphospholipid antibody syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008; 22(1):67-77.
147. Sopena B, Pérez-Rodríguez MT, Rivera A, Ortiz-Rey JA, Lamas J, Freire-Dapena MC. Livedoid vasculopathy and recurrent thrombosis in a patient with lupus: seronegative antiphospholipid syndrome? *Lupus*. 2010; 19(11):1340-1343.
148. Li XN, Grenett HE, Benza RL, Demissie S, Brown SL, Tabengwa EM, Gianturco SH, Bradley WA, Fless GM, Booyse FM. Genotype-specific transcriptional regulation of PAI-1 expression by hypertriglyceridemic, VLDL and Lp(a) in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(11):3215-3223.
149. Galle J, Bengen J, Schollmeyer P, Wanner C. Impairment of endothelium-dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein(a). Role of oxygen-derived radicals. *Circulation*. 1995; 92(6):1582-9.