

Laser Doppler Imaging para quantificação do fluxo sanguíneo de polpa digital em condições basais e após estímulo frio em pacientes com esclerose sistêmica

Marcelo José Uchoa Corrêa¹, Sandro F Perazzio¹, Luís Eduardo Coelho Andrade², Cristiane Kayser³

RESUMO

Objetivo: Determinar o comportamento dinâmico do fluxo sanguíneo da microcirculação digital, antes e após dois estímulos frios (EF) de diferentes intensidades, utilizando o método do *Laser Doppler Imaging* (LDI) em pacientes com esclerose sistêmica (ES) e controles saudáveis. **Métodos:** Foram incluídos 14 pacientes com ES ($51,2 \pm 5,5$ anos de idade) e 12 controles saudáveis ($44,8 \pm 9,9$ anos). Foram realizados dois protocolos alternativos de EF (submersão das mãos em água a 10°C ou 15°C , durante 1 minuto). O fluxo médio das quatro polpas digitais da mão esquerda (FPD) foi mensurado com a utilização do LDI (Moor LDI-VR), em condições basais, nos períodos de 1, 4, 10, 25 e 40 minutos após EF. **Resultados:** O fluxo basal foi significativamente menor em ambos os protocolos em pacientes com ES comparados a controles ($312,9 \pm 102,7$ versus $465,4 \pm 135,4$ PU, $P = 0,006$, no protocolo a 15°C ; $305,2 \pm 121,0$ versus $437,9 \pm 119,8$ PU, $P = 0,01$, no protocolo a 10°C). Nos controles houve declínio significativo do FPD após EF, em comparação aos valores basais apenas no tempo de um minuto após EF a 15°C ($P = 0,001$) e nos tempos de 1 e 25 minutos após EF a 10°C ($P = 0,005$; $P = 0,001$, respectivamente). Nos pacientes com ES, houve declínio significativo do FPD nos tempos de 1, 4 e 10 minutos após ambos EFs ($P < 0,000$; $P = 0,002$; $P = 0,014$, EF a 15°C ; $P < 0,000$; $P = 0,004$; $P = 0,001$, EF a 10°C , respectivamente). **Conclusão:** LDI demonstrou baixa perfusão em polpa digital em condições basais e elevado declínio de perfusão com retardo na recuperação após EF na ES. A quantificação do fluxo sanguíneo pelo LDI pode ser útil para o seguimento longitudinal da doença e para a monitoração de intervenções terapêuticas na ES.

Palavras-chave: esclerose sistêmica, fenômeno de Raynaud, microcirculação, *Laser Doppler imaging*.

INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, caracterizada clinicamente por acometimento vascular e alterações fibróticas da pele e dos órgãos internos.¹ Na maioria dos casos, é possível detectar precocemente alterações vasculares periféricas caracterizadas por anormalidades estruturais e funcionais em pequenos vasos e na microcirculação.

A manifestação clínica mais evidente e precoce do acometimento vascular é o fenômeno de Raynaud (FRy), que ocorre

como primeira manifestação em 70% dos pacientes e em até 95% dos casos ao longo da evolução da doença.² O FRy é definido como uma resposta vasoconstritora anormal ao frio que causa episódios de espasmos recorrentes das artérias digitais, arteríolas e *shunts* cutâneos arteriovenosos. Caracteriza-se por alterações de coloração típicas das extremidades, principalmente mãos e pés, que ocorrem classicamente em três fases sucessivas: palidez, cianose e rubor. No FRy secundário a ES ou doenças de seu espectro, estão presentes alterações estruturais na microcirculação, lesão e disfunção endotelial e

Recebido em 17/03/2009. Aprovado, após revisão, em 24/02/2010. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e, parcialmente, pelos Fundos de Auxílio à Pesquisa e ao Ensino da Sociedade Brasileira de Reumatologia. Os autores não declaram conflitos de interesse. Disciplina de Reumatologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

1. Pós-Graduandos da disciplina de Reumatologia da UNIFESP

2. Professor Adjunto – Livre-Docente, disciplina de Reumatologia da UNIFESP

3. Médica-Assistente e Responsável pelo Ambulatório de Esclerose Sistêmica da disciplina de Reumatologia da UNIFESP

Endereço para correspondência: Cristiane Kayser, Rua Botucatu, 740, 3º andar – São Paulo – SP. CEP 04023-062. E-mail: criskayser@terra.com.br

ativação plaquetária, o que, em geral, torna os eventos vasoespásticos mais graves.³ Observa-se redução acentuada do fluxo sanguíneo, podendo ocorrer até oclusão completa do lúmen do vaso. Todas essas alterações podem acarretar hipóxia tecidual crônica e dano tecidual irreversível, com a formação de úlceras recorrentes, cicatrizes e, em casos mais graves, gangrena e até amputação de extremidades.⁴

Uma questão de extrema relevância diz respeito à necessidade do desenvolvimento de métodos acurados para a avaliação e a quantificação das alterações presentes na microcirculação em pacientes com FRY e ES, seja para o estudo da fisiopatologia da doença, seja para a diferenciação entre pacientes com FRY secundário e aqueles com FRY primário.⁵ Além disso, com o advento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento da ES e do FRY associado a essa enfermidade, métodos objetivos e reproduzíveis para avaliação da resposta terapêutica tornam-se cada vez mais necessários. Esses métodos podem ou não se fazer acompanhar de testes provocativos de isquemia aguda – imersão de extremidades em água gelada ou insuflação de pneumáticos.^{6,7} Até o momento, não há um método considerado padrão-ouro para a avaliação do fluxo sanguíneo da microcirculação em pacientes com FRY primário ou com ES. A fluxometria por Laser Doppler é um método não invasivo que fornece avaliação quantitativa do fluxo sanguíneo da microcirculação e se baseia no efeito Doppler de um feixe de raios refletidos por células sanguíneas em movimento.⁸ O instrumento de Laser Doppler convencional avalia apenas um pequeno ponto circunscrito da pele a cada momento e tem como importante limitação o fato de apresentar grande variabilidade do sinal de um lugar para outro, o que torna o método pouco reproduzível e limita seu uso em ensaios terapêuticos.^{9,10} O aparelho de *Laser Doppler Imaging* (LDI) se baseia em uma técnica relativamente recente que permite a mensuração direta do fluxo sanguíneo da microcirculação cutânea sobre uma área mais ampla, e não em um único ponto. Apresenta também a vantagem de não requerer contato direto com a superfície cutânea, eliminando alterações secundárias à pressão ou por artefatos causados por movimento.^{11,12} Devido a precisão e reproduzibilidade, o LDI é considerado um método promissor para a avaliação dinâmica do fluxo sanguíneo no FRY e em pacientes com ES.¹³

No presente estudo, avaliou-se, pelo método do LDI, a resposta da microcirculação frente a dois estímulos frios de diferentes intensidades em controles saudáveis e em pacientes com ES. Com isso, pretendeu-se avaliar o comportamento dinâmico do fluxo sanguíneo digital na presença desses estímulos frios e descrever as variações observadas entre indivíduos saudáveis e pacientes com ES.

PACIENTES E MÉTODOS

Realizou-se um estudo transversal com pacientes oriundos do Ambulatório de Esclerose Sistêmica do HSP-UNIFESP com diagnóstico de ES, segundo os critérios de classificação do ACR,¹⁴ e que apresentavam FRY e capilaroscopia periungueal com microangiopatia-padrão SD (*scleroderma pattern*).¹⁵ Voluntários saudáveis, pareados para sexo e idade, foram selecionados entre os funcionários do Hospital São Paulo. Excluíram-se pacientes e controles tabagistas, diabéticos, com hipertensão arterial sistêmica grave (pressão arterial diastólica > 105 mmHg) ou que apresentassem vasculopatia central e/ou vasculopatia venosa periférica clinicamente significativa. Qualquer medicação vasodilatadora utilizada pelos pacientes foi suspensa por três dias antes da realização dos testes. Todos os pacientes deveriam ter maioridade civil e assinar o termo ético de consentimento informado aprovado pela Comissão de Ética da UNIFESP sob o número nº 1.298/06.

Após um período de adaptação (repouso por 1 hora em ambiente à temperatura de 24 °C ± 1 °C, com as mãos mantidas, durante a maior parte do tempo, na região axilar para mantê-las aquecidas), todos os pacientes e os controles foram submetidos a dois protocolos alternativos de estímulo frio, de forma consecutiva e no mesmo dia, com intervalo mínimo entre os dois testes de 60 minutos. As condições específicas dos protocolos estão discriminadas a seguir:

Parte I: Avaliação da vasorreatividade da microcirculação cutânea na presença de um estímulo frio de 15 °C

A – Avaliação do fluxo sanguíneo basal da microcirculação cutânea pelo método *Laser Doppler Imaging*. A mão esquerda dos indivíduos foi colocada sobre uma superfície plana (nível do coração) e o fluxo sanguíneo do dorso da falange distal (FPD) dos quatro dedos da mão esquerda (excluindo-se o polegar) foi avaliado em condições basais com o uso do aparelho *Laser Doppler Imaging* (Moor LDI, Moor Instruments, Axminster, Reino Unido). Esse aparelho utiliza um sistema de emissão de laser vermelho hélio-néon de baixa intensidade que opera com um comprimento de onda de 633 nm, com aproximadamente 1 mm de penetração na superfície cutânea. O feixe de luz é direcionado a uma área selecionada da pele por um espelho localizado a uma distância de 40 cm da superfície cutânea. Todas as imagens foram captadas com velocidade de 4 pixel/milissegundo, com tempo de aquisição de 3 minutos e 15 segundos para cada imagem. O fluxo sanguíneo médio da área selecionada foi derivado com o auxílio do aplicativo MoorLDI V5.2 software e expresso em unidades arbitrárias

de perfusão (PU) com relação a uma calibração interna padrão do aparelho. O fluxo médio das quatro polpas digitais (FPD) foi considerado para análise.

B – Estímulo frio (EF). Desencadeou-se o estímulo frio mediante imersão de ambas as mãos em água a 15° C, por 60 segundos (UNITEMP 116, Fanem, Brasil).

C – Monitoração do fluxo sanguíneo da microcirculação cutânea pelo método do *Laser Doppler Imaging* após o EF. O FPD do dorso dos quatro dedos (excluindo-se o polegar) da mão esquerda foi mensurado conforme descrito, de forma contínua, até 25 minutos após o EF. As medidas realizadas a 1, 4, 10 e 25 minutos após o EF foram consideradas para análise.

Parte II: Avaliação da vasorreatividade da microcirculação cutânea na presença de um estímulo frio de 10 °C

O protocolo descrito na Parte I foi repetido observando-se um intervalo mínimo de 60 minutos entre os dois EFs. A principal diferença reside no EF, que consistiu em imersão em água a 10° C por 60 segundos. Outra diferença é que a monitoração do fluxo sanguíneo da microcirculação cutânea após o EF foi realizada até 40 minutos após o EF, e as medidas realizadas a 1, 4, 10, 25 e 40 minutos após o EF foram consideradas para análise.

Análise estatística

A fim de melhor evidenciar as alterações dinâmicas da FPD em função do EF, também se utilizou a variação percentual das medidas de FPD pós-EF com relação à FPD pré-EF, denominada de DFPD, onde:

$$\frac{\text{FPD pós-EF} - \text{FPD pré-EF}}{\text{FPD pré-EF}} \times 100$$

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. Para as análises entre os grupos, utilizou-se o teste *t-Student*, enquanto, para a comparação dos grupos ao longo do tempo, recorreu-se ao ANOVA com medidas repetidas. Para todas as análises, considerou-se o valor de significância inferior a 0,05.

RESULTADOS

Foram incluídos 14 pacientes com ES, com média de idade de 51,2 anos (variando de 41 a 60 anos) e 12 controles saudáveis, média de idade de 44,8 anos (variando de 33 a 54 anos). O tempo médio de doença foi de 9,4 ± 5,8 anos. Cinco pacientes apresentavam a forma cutânea limitada (35,7%) e nove, a forma cutânea difusa (64,3%) da doença (Tabela 1). Nos pacientes com a forma cutânea limitada, o tempo de doença foi de 10,5 ± 4,2 anos e o de início do FRy foi de 12,2 ± 5,1 anos. Naqueles que apresentavam a forma cutânea difusa, o tempo de doença foi de 8,3 ± 5,6 anos e o de início do FRy, de 7,3 ± 6,4 anos. Doze pacientes estavam em uso de vasodilatadores (bloqueadores de canal de cálcio, captopril e losartan).

O FPD basal foi significativamente menor em pacientes com ES comparados a controles em ambos os protocolos de EF (312,9 ± 102,7 *versus* 465,4 ± 135,4 PU, P = 0,006 antes do EF a 15 °C; 305,2 ± 121,0 *versus* 437,9 ± 119,8 PU, P = 0,01 antes do EF a 10 °C) (Figura 1). Não houve diferença no FPD basal entre o primeiro e o segundo protocolo de EF nos controles saudáveis (P = 0,341) ou nos pacientes com ES (P = 0,679), o que confirma a reprodutibilidade do método. O FPD foi significativamente menor nos pacientes com ES quando comparados aos controles em todos os tempos após o EF a 15 °C (P = 0,005, 1 minuto após o EF; P = 0,009, 4 minutos após o

Tabela 1

Dados demográficos dos pacientes com esclerose sistêmica (ES) e controles saudáveis

	Pacientes com ES (n = 14)	Controles saudáveis (n = 12)	P
Idade (anos)	51,2 ± 5,5	44,8 ± 9,1	NS
Sexo	13F/1M	9F/3M	NS
Forma clínica	5 Difusa/9 Limitada	–	–
Tempo de FRy (anos)	9,4 ± 6,1	–	–
Tempo de doença (anos)	9,4 ± 5,8	–	–
Número de pacientes com úlceras ativas (%)	6 (42,8)	–	–
FAN positivo (n)	13	–	–
Anti-Scl 70 positivo (n)	2	–	–
Anticentrômero positivo (n)	5	–	–

NS: não significante; FRy: Fenômeno de Raynaud; FAN: anticorpo antinúcleo.

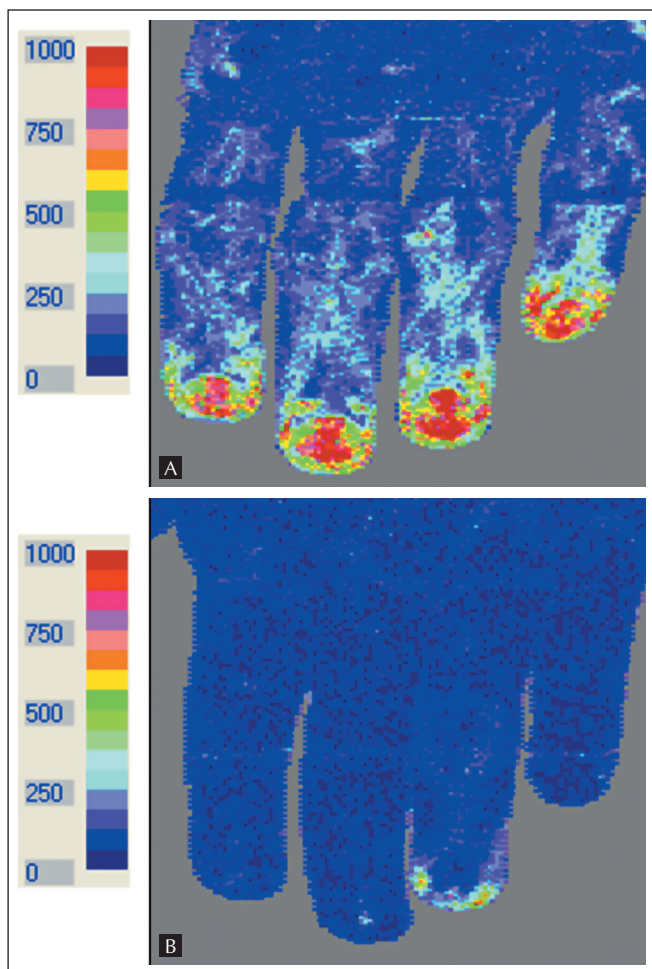


Figura 1
Fluxo sanguíneo basal em um controle saudável (A) e em um paciente com esclerose sistêmica (B) pelo método do Laser Doppler Imaging.

EF; $P = 0,001$, 10 minutos após o EF; $P = 0,016$, 25 minutos após o EF) e nos tempos 1, 4 e 10 minutos após o EF a 10°C ($P < 0,001$; $P = 0,008$; $P = 0,002$, respectivamente) (Tabela 2).

Observamos uma queda abrupta do FPD 1 minuto após os dois EFs tanto nos pacientes com ES quanto nos controles, seguida de recuperação gradual do fluxo sanguíneo, que foi retardada nos pacientes com ES (Figura 2). Nos controles saudáveis, houve declínio significativo do FPD após EF a 15°C , em comparação aos valores basais apenas no tempo de 1 minuto após EF ($P = 0,001$). Nestes, houve rápida recuperação do FPD, e não houve diferença estatisticamente significativa na comparação do FPD basal com os valores de FPD a 4, 10 e 25 minutos após o EF a 15°C ($P = 0,055$; $P = 0,55$; $P = 1,00$, respectivamente). Já a 10°C , observamos, nos indivíduos normais, diferença significativa no FPD pós-EF em comparação com o FPD basal nas medidas 1 e 25 min após o EF ($P = 0,005$; $P = 0,001$, respectivamente). Nos pacientes com ES, houve declínio significativo do FPD a 1, 4 e 10 minutos, tanto após o EF a 15°C ($P < 0,000$; $P = 0,002$; $P = 0,014$, respectivamente) quanto após o EF a 10°C ($P < 0,000$; $P = 0,004$; $P = 0,001$, respectivamente). Houve recuperação do FPD na comparação com o FPD basal apenas 25 minutos após o EF ($P = 0,146$ a 15°C ; $P = 0,25$ a 10°C) (Figura 2). A magnitude da queda do FPD (DEF-FPD) foi mais acentuada em pacientes com ES comparados aos controles 1 minuto após EF a 10°C ($-72,5 \pm 63\%$ versus $-35,3 \pm 15\%$) (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos, de forma inédita, o comportamento dinâmico do fluxo sanguíneo da microcirculação digital antes e após dois estímulos frios de intensidades distintas, com o uso

Tabela 2

Fluxo sanguíneo médio das quatro polpas digitais em unidades de perfusão (PU) e variação percentual após estímulo frio a 15°C e 10°C (DEF-FPD) em pacientes com esclerose sistêmica (ES) e controles saudáveis

	Basal	Estímulo Frio a 15°C				
		1 min	4 min	10 min	25 min	
Controles	465,43 ± 135,38	273,27 ± 183,22	345,33 ± 196,84	424,57 ± 151,45	419,77 ± 147,08	
ES	322,91 ± 102,72	115,89 ± 55,07	172,13 ± 108,88	223,56 ± 106,79	284,92 ± 117,83	
$\Delta\text{EF-FPD}$ controles		-41,2 ± 30,18%	-25,7 ± 20,2%	-8,7 ± 2,26%	-9,8 ± 6,45%	
$\Delta\text{EF-FPD}$ ES		-64,1 ± 48,7%	-46,6 ± 7,2%	-30,7 ± 18,32%	-11,7 ± 5,0%	
P (FPD controles versus ES)	0,006	0,005	0,009	0,001	0,016	
	Basal	Estímulo Frio a 10°C				
		1 min	4 min	10 min	25 min	40 min
Controles	437,97 ± 119,79	283,43 ± 138,72	299,10 ± 169,63	381,20 ± 153,35	275,48 ± 107,55	312,75 ± 161,59
ES	305,16 ± 121,00	83,76 ± 43,83	133,97 ± 118,39	199,3 ± 105,79	227,44 ± 126,82	255,50 ± 124,46
$\Delta\text{EF-FPD}$ controles		-35,2 ± 12,84%	-31,7 ± 12,4%	-12,9 ± 10,40%	-37,1 ± 25,10%	-28,5 ± 17,38%
$\Delta\text{EF-FPD}$ ES		-72,5 ± 62,87%	-56,0 ± 21,2%	-34,6 ± 22,93%	-25,4 ± 6,39%	-16,2 ± 5,02%
P (FPD controles versus ES)	0,01	0,000	0,008	0,002	0,312	0,247

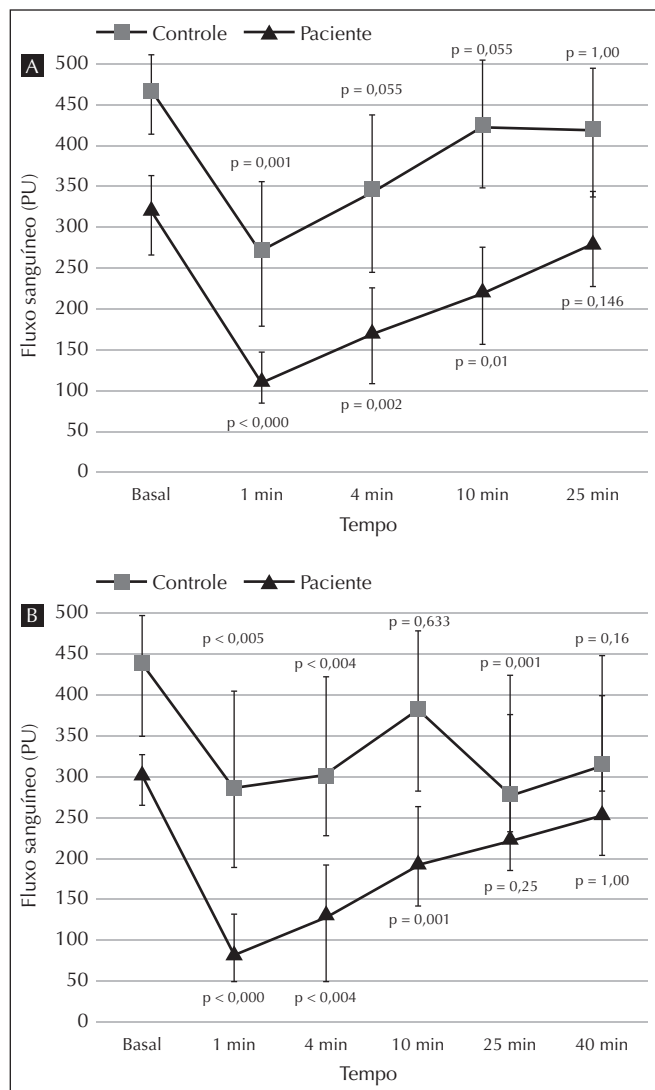


Figura 2 Fluxo sanguíneo médio em unidades de perfusão (PU), antes e após estímulo frio, a 15°C (A) e 10°C (B), em polpas digitais de pacientes com esclerose sistêmica (ES) e controles saudáveis.

do LDI em pacientes com FRY secundário à ES, em comparação a indivíduos saudáveis. Em condições basais, pacientes com ES apresentaram FPD significativamente menor quando comparados a controles saudáveis. Como esperado, após estímulo frio, houve queda significativa do FPD em ambos os grupos estudados, tanto a 15 °C quanto a 10 °C, e essa queda foi mais acentuada nos pacientes com ES. Observamos recuperação rápida do FPD nos controles saudáveis, principalmente a 15 °C (já observada no tempo de 4 minutos após o EF), ao contrário dos pacientes com ES, que apresentaram um retardo na recuperação do FPD após estímulo frio. A curva de

recuperação após EF a 15 °C foi capaz de caracterizar melhor os dois grupos.

A observação de valores basais de FPD mais baixos nos pacientes com ES corrobora achados prévios que revelam alterações morfológicas conspícuas, desvascularização e redução do fluxo sanguíneo na pequena e da microcirculação desses indivíduos.^{16,17} A queda mais acentuada do FPD após EF observada na maioria dos pacientes com ES talvez decorra de alterações na dinâmica do fluxo sanguíneo agravadas pelas condições desfavoráveis decorrentes das alterações estruturais da microcirculação encontradas nesses indivíduos. A vasorreatividade da microcirculação cutânea é, em geral, uma resposta protetora condicionada à perda de calor. Ao se fazer um estímulo frio, os pacientes esclerodérmicos apresentam uma resposta sabidamente exacerbada à isquemia aguda, com aumento abrupto do tônus vascular, redução acentuada do fluxo sanguíneo e até um possível fechamento das arteríolas digitais.^{18,19}

É difícil reproduzir, de forma consistente e objetiva, na prática clínica os eventos vasoespásticos em pacientes com FRY primário ou secundário. Nesse sentido, utilizam-se diversos métodos para mensuração objetiva da intensidade da vasorreatividade ao frio em cada paciente com FRY, como termografia, medida da pressão sistólica digital, laticemia de polpa digital, pletismografia, o Laser Doppler convencional e o LDI.^{5,12,19-23} A termografia é um método de avaliação indireta que avalia a temperatura cutânea sobre determinada área. A medida da pressão sistólica digital é útil para a avaliação do fluxo da artéria digital; no entanto, não avalia a microcirculação. Já a pletismografia avalia as alterações volumétricas sanguíneas em determinados segmentos e parece ser um método pouco reprodutível.⁵ O LDI, por sua vez, é capaz de avaliar diretamente o fluxo sanguíneo da microcirculação cutânea. Além disso, o LDI permite a avaliação de áreas maiores da microcirculação cutânea, com resultados mais reprodutíveis e representativos quando comparado com o método do Laser Doppler convencional. Clark *et al.*¹⁰ utilizaram o LDI para avaliar o fluxo sanguíneo do dorso das mãos e dos dedos em controles saudáveis, pacientes com FRY primário e pacientes com ES na forma cutânea difusa e limitada à temperatura ambiente de 23 °C e 30 °C. Os autores encontraram diferença relevante no fluxo sanguíneo entre os quatro grupos avaliados, principalmente ao avaliarem a diferença máxima entre os fluxos de diversos dedos da mesma mão à temperatura ambiente de 23 °C. Observe que as diferenças mais expressivas foram encontradas em pacientes com ES na forma cutânea limitada e as menores em controles normais.

O método do LDI também foi utilizado para avaliar a resposta terapêutica à trinitroglicerina tópica em pacientes

com FRy primário e pacientes com ES.²⁴ Houve aumento do fluxo sanguíneo digital após a aplicação da trinitroglicerina em todos os grupos avaliados, quando comparado com o uso de placebo. Mais recentemente, Salsano *et al.*,²⁵ ao avaliarem o tratamento no longo prazo com N-acetilcisteína por via endovenosa no FRy secundário à ES, encontraram aumento significativo da perfusão global das mãos após o tratamento pelo método do LDI. Esses estudos apontam o *Laser Doppler Imaging* como uma poderosa ferramenta para a quantificação do fluxo sanguíneo da microcirculação e para a monitoração objetiva de resposta terapêutica em pacientes com FRy e ES. Entretanto, até o momento, existem poucos estudos na literatura avaliando a vasorreatividade da microcirculação cutânea em resposta a estímulo frio em pacientes com FRy e/ou ES com o uso desse método.^{12,26} Picart *et al.*²⁶ avaliaram a perfusão digital com o LDI antes e após um estímulo frio local (placa fria a 5 °C por 8 minutos) em oito pacientes com ES, dez com FRy primário e sete controles saudáveis. De forma semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, os pacientes com ES apresentaram fluxo sanguíneo menor em condições basais e decréscimo mais acentuado do fluxo após o estímulo frio quando comparados com os controles saudáveis.

Já para a avaliação objetiva da reatividade vascular ao frio em indivíduos com FRy, diferentes protocolos de estímulo frios são realizados como a imersão de ambas as mãos ou de apenas uma mão em água a temperaturas variáveis (gelo até 20 °C) ou resfriamento de corpo total.²⁷⁻³⁰ Em nosso estudo, realizamos dois protocolos de EF com o objetivo de padronizar o teste de EF com o uso do LDI e quantificar, de forma objetiva, as alterações do fluxo sanguíneo da microcirculação relacionadas à fisiopatologia do FRy. Com esse fim, tentamos avaliar qual EF seria capaz de melhor distinguir os indivíduos saudáveis dos pacientes com FRy secundário à ES. O EF a 15 °C por 1 minuto foi usado por O'Reilly *et al.*³⁰ e foi considerado adequado para a avaliação de curvas de recuperação do fluxo sanguíneo na presença de um EF. O EF de 10 °C vem sendo utilizado por nosso grupo em vários estudos, em associação ao teste de

lacticemia de polpa digital, também mostrando capacidade de diferenciação entre pacientes com FRy secundário, FRy primário e controles saudáveis.²¹⁻²³ Entretanto, o EF a 10 °C é mais desconfortável e potencialmente mais danoso para os pacientes com FRy. O presente estudo mostrou que não são necessários EFs muito intensos ou prolongados para reproduzir um vasoespasmó em resposta a um EF ou para distinguir pacientes com FRy secundário de indivíduos saudáveis pelo método do LDI. Além disso, com base nos resultados obtidos em nosso estudo, um EF a 10 °C também pareceu causar uma vasoconstrição muito intensa, mesmo em indivíduos saudáveis, prejudicando, assim, a discriminação entre pacientes e controles sadios.

Deve-se lembrar também que medidas do fluxo sanguíneo periférico podem ser influenciadas por uma série de fatores, como baixa temperatura ambiente, duração da aclimatização, tabagismo, alterações hormonais, uso de drogas com ação vasodilatadora ou vasoconstritora e estresse.^{31,32} Em nosso estudo, tentamos minimizar a influência de fatores extrínsecos, mediante a adoção de um protocolo homogêneo aplicado a todos os participantes que consistia em adaptação em um ambiente tranquilo com temperatura controlada, a não inclusão de tabagistas, além da suspensão de drogas vasodilatadoras três dias antes dos experimentos.

Em conclusão, o presente estudo mostrou valores significativamente mais baixos do FPD em condições basais em pacientes com ES quando comparados a controles saudáveis. Após estímulo frio, houve queda significativa do FPD em ambos os grupos estudados, tanto no protocolo a 15 °C quanto a 10 °C, e tal queda foi mais acentuada nos pacientes com ES, principalmente 1 minuto após o EF. O EF a 15 °C foi capaz de distinguir melhor os dois grupos entre si. A quantificação do FPD associada a um EF poderá, assim, ser útil para a avaliação de ensaios terapêuticos e acompanhamento longitudinal de pacientes com FRy secundário à ES. Estudos prospectivos avaliando um número maior de pacientes com ES e pacientes com FRy primário poderão definir melhor o papel do LDI para diagnóstico e monitoramento desses pacientes.

1. Tan FK. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:211-37.
2. Seibold JR. Scleroderma. In: Kelley WN, Ruddy S, Harris ED & Sledge CB. Textbook of rheumatology. Philadelphia-USA: WB Saunders Company; 1997.
3. Campbell PM, LeRoy EC. Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum* 1975;4:351-68.
4. Chung L, Fiorentino D. Digital ulcers in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity Rev* 2006;5:125-8.
5. Herrick AL, Clark S. Quantifying digital vascular disease in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1998;57:70-7.
6. Engelhart M. Clinical and physiological studies of Raynaud's phenomenon. *Dan Med Bull* 1991;38:458-67.
7. Maricq HR, Weinrich MC, Valter I, Palesch YY, Maricq JG. Digital vascular responses to cooling in subjects with cold sensitivity, primary Raynaud's phenomenon, or scleroderma spectrum disorders. *J Rheumatol* 1996;23:2068-78.
8. Essex TJ, Byrne PO. A Laser Doppler Scanner for imaging blood flow in skin. *J Biomed Eng* 1991;13:189-94.
9. Anderson ME, Hollis S, Moore T, Jayson MI, Herrick AL. Non-invasive assessment of vascular reactivity in forearm skin of patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1996;35:1281-8.
10. Clark S, Campbell F, Moore T, Jayson MI, King TA, Herrick AL. Laser Doppler Imaging. A new technique for quantifying microcirculatory flow in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Microvasc Res* 1999;57:284-91.
11. Murray AK, Gorodkin RE, Moore TL, Gush RJ, Herrick AL, King TA. Comparison of red and green laser Doppler imaging of blood flow. *Lasers Surg Med* 2004;35:191-200.
12. Seifalian AM, Stansby G, Jackson A, Howell K, Hamilton G. Comparison of laser Doppler perfusion imaging, laser Doppler flowmetry, and thermographic imaging for assessment of blood flow in human skin. *Eur J Vasc Surg* 1994;8:65-9.
13. Herrick AL. Diagnosis and management of scleroderma peripheral vascular disease. *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:89-114.
14. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.
15. Maricq HR, LeRoy EC, D'Angelo WA *et al*. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980;23:183-9.
16. Kahaleh MB. Vascular involvement in systemic sclerosis (SSc). *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:S19-23.
17. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992;166:255-63.
18. Flavahan NA. Regulation of vascular reactivity in scleroderma: new insights into Raynaud's phenomenon. *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:81-7.
19. Kurki TS, Piirainen HI, Kurki PT. Non-invasive monitoring of finger arterial pressure in patients with Raynaud's phenomenon: effects of exposure to cold. *Br J Anaesth* 1990;65: 558-63.
20. Clark S, Dunn G, Moore T, Jayson M IV, King TA, Herrick AL. Comparison of thermography and laser Doppler imaging in the assessment of Raynaud's phenomenon. *Microvasc Res* 2003;66:73-6.
21. Kayser C, Pucinelli MLC, Fontenelle SMA, Andrade LEC. Cold stimulus-fingertip lacticemia: standardization of the test in normal volunteers and diagnostic application for systemic sclerosis. *Microvasc Res* 2005;70:84-9.
22. Fontenelle SMA, Kayser C, Pucinelli MLC, Andrade LEC. Cold stimulus-fingertip lacticemia test – an effective method to monitor acute nifedipine effects on primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008;47:80-3.
23. Pucinelli MLC, Fontenelle SMA, Andrade LEC. Determination of fingertip lacticemia before and after cold stimulus in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2002;29:1401-03.
24. Anderson ME, Moore TL, Hollis S, Jayson MI, King TA, Herrick AL. Digital vascular response to topical glyceryl trinitrate, as measured by laser Doppler imaging, in primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Rheumatology* 2002;41:324-8.
25. Salsano F, Letizia C, Proietti M *et al*. Significant changes of peripheral perfusion and plasma adrenomedullin levels in N-acetylcysteine long term treatment of patients with sclerodermic Raynaud's phenomenon. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005;18:7761-70.
26. Picart C, Carpentier PH, Brasseur S, Galliard H, Piau JM. Systemic sclerosis: blood rheometry and laser Doppler imaging of digital cutaneous microcirculation during local cold exposure. *Clin Hemorheol* 1998;18:47-58.
27. White CJ, Phillips WA, Abrahams LA, Watson TD, Singleton PT Jr. Objective benefit of nifedipine in the treatment of Raynaud's phenomenon. Double-blind controlled study. *Am J Med* 1986;80:623-5.
28. Engelhart M, Kristensen JK. Colour changes during Raynaud's phenomenon and finger blood supply during direct and indirect cooling procedures. *Clin Exp Dermatol* 1987;12:339-42.
29. Rademaker M, Cooke ED, Almond NE *et al*. Comparison of intravenous infusions of iloprost and oral nifedipine in treatment of Raynaud's phenomenon in patients with systemic sclerosis: a double blind randomised study. *BMJ* 1989;298:561-4.
30. O'Reilly D, Taylor L, El-Hadidy K, Jayson MIV. Measurement of cold challenge responses in primary Raynaud's phenomenon and Raynaud's phenomenon associated with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1193-6.
31. Cleophas TJ, Fennis JF, van't Laar A. Finger temperature after a finger-cooling test: influence of air temperature and smoking. *J Appl Physiol* 1982;52:1167-71.
32. Bartelink ML, Wollersheim H, Leesmans E, De Boo Th, Thien Th. A standardized finger cooling test for Raynaud's phenomenon: diagnostic value and sex differences. *Eur Heart J* 1993;14:614-22.