

ZELITA APARECIDA DE JESUS QUEIROZ

Estudo do remodelamento cutâneo durante o desenvolvimento do modelo de esclerose sistêmica induzido com colágeno V

SÃO PAULO

2024

ZELITA APARECIDA DE JESUS QUEIROZ

Estudo do remodelamento cutâneo durante o desenvolvimento do modelo de esclerose sistêmica induzido com colágeno V

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientadora: Dra. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro

SÃO PAULO

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Queiroz, Zelita Aparecida de Jesus

Estudo do remodelamento cutâneo durante o desenvolvimento do modelo de esclerose sistêmica induzido com colágeno V / Zelita Aparecida de Jesus Queiroz; Walcy Paganelli Rosolia Teodoro, orientador. -- São Paulo, 2024.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Colágeno V 2. Esclerose sistêmica 3. Pele 4. Fibroblasto
5. Modelo experimental 6. Fibrillogênese I. Teodoro, Walcy Paganelli Rosolia, orient. II. Título

USP/FM/DBD-042/24

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais Ozineia e Antônio, por
todos os ensinamentos, dedicação, incentivo,
amor e cuidado.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade e pelas pessoas incríveis que colocou em minha vida.

Durante esta jornada muitas pessoas participaram da minha vida, dentre estas pessoas algumas se tornaram muito especiais, cada uma ao seu modo, seja pessoalmente ou academicamente.

À minha querida orientadora, Dra. Walcy Rosolia Teodoro, obrigada pela oportunidade de realizar esse projeto e acreditar no meu potencial para realizá-lo. Obrigada por todos os ensinamentos, pela dedicação, paciência e carinho ao longo desses anos. Obrigada por ser uma amiga e muitas das vezes mãe, pelo cuidado e carinho que você tem por todos os seus alunos, você é um exemplo de dedicação e perseverança.

À Dra. Ana Paula Velosa, por tudo que me ensinou com paciência e dedicação, por sua disposição de sempre me auxiliar na padronização das técnicas e experimentos, obrigada pela sua amizade e carinho ao longo dessa jornada.

À Solange Carrasco, por todos os ensinamentos na cultura celular, obrigada pela confiança, amizade e carinho ao longo desses anos.

Aos Dr. Sergio Catanozi e Antônio Santos Filho por todo auxílio com os animais durante o experimental, obrigada por todos os conselhos e ensinamentos.

À Prof. Dra. Vera Luiza Capelozzi, por seus ensinamentos e por sua disponibilidade em auxiliar em cada etapa deste projeto.

À Dra. Debora Levy, por estar sempre disposta a nos ajudar e esclarecer nossas dúvidas, obrigada por todo esforço, paciência e dedicação para cultivar os fibroblastos, obrigada pelos ensinamentos no cultivo de células.

Agradeço a Juliana Sampaio Silva, por toda ajuda e disponibilidade para me auxiliar nas técnicas de cultivo celular e imunofluorescência.

Agradeço à Dra. Denise Frediani, por toda ajuda e paciência na biologia molecular, obrigada por todos os ensinamentos.

Agradeço à Sandra Fernezlian e Esmeralda, pela padronização e realização das reações de imunohistoquímica.

À Cleonice, por toda ajuda e realização da técnica de FAN.

Agradeço à Dra. Aritania Sousa Santos, por estar sempre disposta a nos ajudar e por esclarecer as minhas dúvidas na biologia molecular, obrigada pelos ensinamentos valiosos e por ter me recebido com tanto carinho.

À Mayra, obrigada pela sua alegria e disposição em nos ajudar sempre.

Às minhas grandes amigas e companheiras de mestrado, Lizandre, Vitória, Thays e Amanda, que ao longo dessa jornada se tornaram minhas irmãs, obrigada por caminharem junto comigo durante esses anos, por serem meu ombro amigo nos momentos difíceis, e por tornarem essa caminhada mais divertida e alegre, vocês são um presente de Deus em minha vida, Ele sabia que eu precisava de vocês para suportar e superar os desafios dessa caminhada científica. Obrigada minhas irmãs por toda ajuda, amor e carinho, nossa amizade é para toda vida, vocês sempre estarão em meu coração.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Jaíne, Fabiola, Vitor, Valéria e Jurandir por toda parceria, ajuda e bons momentos compartilhados.

Aos meus amados pais, Ozineia e Antônio, obrigada por sempre acreditarem em meus sonhos, por nunca duvidarem das minhas escolhas e por não medirem esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiante. Obrigada por sempre terem uma palavra de conforto e incentivo nos momentos que eu mais precisava, a vocês devo tudo o que sou.

Ao meu querido irmão Pedro Luiz, que sem entender nada de ciência sempre ouvia com atenção e carinho as minhas conversas sobre os meus experimentos, obrigada por sempre me apoiar.

Ao meu irmão caçula Davi Luiz, o meu amorzinho, por sempre me receber com um abraço apertado, e sempre perguntar como foi o meu dia no laboratório.

As minhas amadas tias, Maria Roseli, Rosemeire e Elaine, por sempre orarem por mim e acreditarem nos meus sonhos, obrigada por me ajudarem, direta ou indiretamente, nesta minha etapa.

Ao amor da minha vida, meu noivo Renan Gama, por todo companheirismo e paciência, por estar sempre presente, me ajudando, me ouvindo e me incentivando. Obrigada por ser o meu ponto de paz e segurança, te amo.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Este trabalho recebeu apoio financeiro de:

CAPES: Bolsa de Mestrado – Cota Institucional (Demanda Social), processo nº88887.684433/2022-00

EPÍGRAFE

*E não nos cansemos de fazer o bem, pois no tempo
próprio colheremos, se não desanimarmos.*

Gálatas 6:9

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE EQUAÇÃO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	7
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da esclerose sistêmica	1
1.2. Colágeno	6
1.3. Biossíntese dos colágenos fibrilares	6
1.4. Colágeno na pele	7
1.5. Colágeno do tipo V	9
1.6 Modelos experimentais de Esclerose Sistêmica	11
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVO	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Animais	20
4.2 Protocolo Experimental	20
4.2.1 Indução de Esclerodermia Experimental	20
4.3. Coleta do soro	22
4.4. Coleta da pele	22
4.5. Análise morfológica da pele	22
4.6. Avaliação da espessura da pele	23
4.7. Imunofluorescência para o colágeno dos tipos I, III e V	23
4.8. Análise morfométrica do colágeno I, III e V por análise de imagem	24
4.9. Colocalização dos colágenos I, III, V e α - AML por imunofluorescência	24
4.10. Imuno-histoquímica para α -AML, Vimentina, VEGF e Caspase-3	25
4.11. Quantificação de α -AML, Vimentina, VEGF e Caspase-3	26
4.12. Cultura de fibroblastos cutâneos	26
4.13. Detecção de colágeno dos tipos I, III e V e α -AML em fibroblastos dérmicos do IMU-COLV	27
4.14. Detecção de colágeno dos tipos I, III e V e α -AML em fibroblastos cutâneos de animal controle estimulados com Col V	28
4.15. Quantificação de colágeno pela dosagem da 4-hidroxiprolina	29

4.16. Extração de RNAm de tecido cutâneo	30
4.17. Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras	31
4.18. Transcrição Reversa.....	31
4.19. Análise da Expressão Gênica por RT-qPCR	32
4.20. Pesquisa de anticorpos anti-células HEp-2 (FAN).....	33
4.21. Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Perfil morfológico da pele durante o desenvolvimento do modelo de ES	36
5.2 Avaliação bioquímica da pele	39
5.3 Análise estrutural da matriz fibrilar da pele durante o desenvolvimento do modelo de ES.....	40
5.4 Expressão dos genes <i>Col1a1</i> , <i>Col3a1</i> , <i>Col5a1</i> e <i>Col5a2</i> na pele	46
5.5 Análise de fibroblastos e miofibroblastos na pele durante o desenvolvimento do modelo de ES.....	47
5.6 Análise da reatividade vascular e apoptose celular	50
5.7 Análise da fibrilogênese e diferenciação de fibroblastos na pele durante o desenvolvimento do modelo de ES	53
5.8 Avaliação da expressão das proteínas da matriz extracelular em fibroblastos dérmicos do modelo IMU-COLV	64
5.9 Análise da expressão das proteínas da matriz extracelular em fibroblastos dérmicos estimulados com Col V.....	66
5.10 Análise da expressão da proteína α -AML em fibroblastos dérmicos estimulados com Col V	70
5.11 Manifestações Imunológicas.....	71
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos moleculares da ES.....	3
Figura 2 - Biossíntese e processo de maturação do colágeno Erro! Indicador não definido.	
Figura 3 - Desenho esquemático da pele.....	8
Figura 4 - Esquema do protocolo de imunização com Col V Erro! Indicador não definido.	
Figura 5 - Painel de H&E e espessura	37
Figura 6 - Painel de Masson.....	38
Figura 7 - Concentração de colágeno total na pele.....	39
Figura 8 - Imunofluorescência para colágeno do tipo I no tecido cutâneo.	41
Figura 9 - Imunofluorescência para colágeno do tipo III no tecido cutâneo.	43
Figura 10 - Imunofluorescência para colágeno do tipo III no tecido cutâneo. Erro! Indicador não definido.	
Figura 11 - Expressão relativa dos genes Col1a1, Col3a1, Col5a1 e Col5a2..	46
Figura 12- Imunomarcção para Vimentina no tecido cutâneo.....	48
Figura 13 - Imunomarcção para α -AML no tecido cutâneo.	49
Figura 14 - Imunomarcção para VEGF no tecido cutâneo.	51
Figura 15 - Imunomarcção para Caspase 3 no tecido cutâneo.....	52
Figura 16- Colocalização para colágeno I e III no tecido cutâneo em 45 dias.	55
Figura 17- Colocalização para colágeno I e V no tecido cutâneo em 45 dias.	56
Figura 18- Colocalização para colágeno I e α -AML no tecido cutâneo em 45 dias	57
Figura 19 - Colocalização para colágeno V e α -AML no tecido cutâneo em 45 dias.....	58
Figura 20 – Colocalização para colágeno I e III no tecido cutâneo em 120 dias.	60
Figura 21 - Colocalização para colágeno I e V no tecido cutâneo em 120 dias.	61
Figura 22 - Colocalização para colágeno I e α -AML no tecido cutâneo em 120 dias.....	62
Figura 23- Colocalização para colágeno V e α -AML no tecido cutâneo em 120 dias.....	63
Figura 24 - Expressão do Col I, Col III, Col V e α -AML em fibroblastos de pele do grupo IMU-COLV 120 dias	65
Figura 25 - Expressão de Colágeno tipo I em fibroblastos de pele de camundongo controle.	67
Figura 26 - Expressão de Colágeno tipo III em fibroblastos de pele de camundongo controle.....	68
Figura 27 - Expressão de Colágeno tipo V em fibroblastos de pele de camundongo controle.....	69
Figura 28 - Expressão da α -AML em fibroblastos de pele de camundongo controle.....	71
Figura 29 - Padrões representativos da pesquisa de Fator Antinuclear (FAN).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Modelos experimentais de ES.....	14
Tabela 2 -Tabela de volumes dos reagentes para reação de transcrição reversa	31
Tabela 3 - Relação das sequências de oligonucleotídeos estudados	32

LISTA DE EQUAÇÃO

Equação 1- Cálculo da concentração de 4-hidroxirolina	29
Equação 2- Cálculo $\Delta\Delta CT$	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Adjuvante completo de <i>Freund</i>
AIF	Adjuvante incompleto de <i>Freund</i>
ACA	Anticorpo anticentrômero
AML	Alfa actina do músculo liso
ATA	Anti-topoisomerase
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
Col I	Colágeno tipo I
Col III	Colágeno tipo III
Col V	Colágeno tipo V
CTGF	Crescimento do tecido conjuntivo
DEMEM	Meio de dulbecco modificado por eagle (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DPBS	Salina fosfato- tamponada de dulbecco (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ES	Esclerose sistêmica
ET-1	Endotelina-1
FAN	Fator antinuclear
FLi1	Fator <i>friend leukemia integration I</i>
FRA-2	Antígeno 2 relacionado com <i>Fos</i>
g	Grama
H&E	Hematoxilina-eosina
IFN	Interferon tipo I
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-13	Interleucina 13
KLF5	Fator <i>Kruppel-Like</i>
MEC	Matriz extracelular

TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
PBS	Tampão Fosfato-salino
PDGF	Fatos de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
mRNA	RNA mensageiro
rcf	Força centrífuga relativa
RT-qPCR	Reação de transcrição reversa seguida da reação de polimerização em cadeia, em tempo real
ScI-70	Anti-Topoisomerase-I
ScI-GVHD	Doença Esclerodermatosa do Enxerto Contra o Hospedeiro
TSK-1	<i>Tight skin</i> tipo 1
TSK-2	<i>Tight skin</i> tipo 2
uPAR	Receptor ativador do plasminogênio tipo uroquinase
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
mg	Miligrama
NH3	Amina terminal
µg	Micrograma
µl	Microlitro
vs	Versus
x	Vezes
α1(V)	Cadeia alfa 1 do colágeno V
α2(V)	Cadeia alfa 2 do colágeno V
α3(V)	Cadeia alfa 3 do colágeno V

RESUMO

Queiroz ZAJ: Estudo do remodelamento cutâneo durante o desenvolvimento do modelo de esclerose sistêmica induzido com colágeno V [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença crônica do tecido conjuntivo caracterizada por vasculopatia proliferativa, reatividade imunológica e fibrose da pele e órgãos internos. A excessiva deposição de colágeno é a característica mais marcante na patogênese da ES. Estudos recentes do nosso grupo revelaram que, nos estágios iniciais da doença, ocorre distorção do padrão fibrilar da pele, aumento da síntese de colágeno V (Col V) e da expressão dos genes COLVA1 e COLVA2, correlacionados com a atividade da doença. O mecanismo pelo qual o Col V potencializa a reatividade autoimune e a produção de colágeno, resultando em fibrose anômala, ainda não é conhecido. Considerando que modelos animais são recursos valiosos para investigar os mecanismos da doença, nossa proposta neste estudo foi avaliar a constituição e o desenvolvimento da fibrose cutânea no modelo no modelo IMU-COLV em camundongos C57BL/6, após 15, 30, 45 e 120 dias de imunização e caracterizar a fibrilogênese após a ativação de fibroblastos com Col V “*in vitro*”. Para o estudo “*in vivo*” foi estabelecido os grupos imunizados com Col V (IMU-COLV) por 15, 30, 45 e 120 dias após a primeira imunização. Foram realizadas análises morfológica, histomorfométrica e imunohistoquímica para α -actina do músculo liso (α -AML), vimentina, VEGF e caspase-3, dosagem bioquímica da 4-hidroxiprolina, imunofluorescência (IF) para colágeno I/III/V e expressão gênica por qRT-PCR. Ainda, no estudo “*in vitro*”, foram analisados a expressão do colágeno I/III/V e α -AML em fibroblastos dérmicos estimulados com Col V. Após a indução da ES, observou-se aumento significativo do espessamento da derme entre os grupos IMU-COLV 15 e 45 dias e aumento de Col I e III no grupo IMU-COLV 120 dias. O aumento de Col V foi significativo nos grupos IMU-COLV 45 e 120 dias, assim como a quantidade aumentada da 4-hidroxiprolina no grupo IMU-COLV 45 dias. Houve aumento de células positivas para VEGF+ e caspase-3+ na derme dos grupos IMU-COLV 45 e 120 dias, e aumento de células

positivas para α -AML+ na derme dos animais do grupo IMU-COLV 120 dias, enquanto a positividade para vimentina não foi significativa entre os grupos estudados. Os genes *Col1a1* e *Col3a1* não apresentaram diferença significativa entre os grupos, mas *Col5a1* e *Col5a2* tiveram maior expressão no grupo IMU-COLV 15 dias. Adicionalmente, detectou-se positividade para o Fator Antinuclear (FAN) nos soros dos animais a partir de 30 dias após a imunizações. Por outro lado, “*in vitro*”, fibroblastos dérmicos estimulados com Col V mostraram fibrilogênese alterada e aumento da expressão de Col I, Col III, Col V e α -AML. Portanto, esse estudo mostrou que o modelo IMU-COLV desenvolve uma fibrose na pele após 45 dias de imunização constituída de Col I, III e grandes quantidades de Col V. Esse estudo sugere que essa alteração na proporção fibrilar pode ser resultante não só pelos mecanismos de ativação das proteínas da matriz, como o Col V, mas também pela reatividade imunológica, levando a diferenciação dos fibroblastos e conseqüentemente alterando a produção de colágeno, que é a principal característica da ES.

Palavras-chave: Colágeno V. Esclerose sistêmica. Pele. Fibroblasto. Modelo experimental. Fibrilogênese.

ABSTRACT

Queiroz ZAJ: Study of skin remodeling during development of the collagen V-induced systemic sclerosis model [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2024.

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic connective tissue disease characterized by proliferative vasculopathy, immunological reactivity, and fibrosis of the skin and internal organs. Excessive collagen deposition is the most striking feature in the pathogenesis of SSc. Recent studies from our group revealed that, in the early stages of the disease, there is distortion of the skin fibrillar pattern, increased synthesis of collagen V (Col V) and expression of the COLVA1 and COLVA2 genes, correlated with disease activity. The mechanism by which Col V potentiates autoimmune reactivity and collagen production, resulting in anomalous fibrosis, is still unknown. Considering that animal models are valuable resources to investigate the mechanisms of the disease, our proposal in this study was to evaluate the constitution and development of cutaneous fibrosis in the IMU-COLV model in C57BL/6 mice, after 15, 30, 45 and 120 days. immunization and characterize fibrillogenesis after activation of fibroblasts with Col V "in vitro". Considering that animal models are a valuable resource for investigating disease mechanisms, the aim of this study was to evaluate the constitution and development of cutaneous fibrosis in the IMU-COLV model in C57BL/6 mice, after 15, 30, 45, and 120 days of immunization, and to characterize fibrillogenesis after fibroblast activation with Col V "in vitro". For the "in vivo" study, groups immunized with Col V (IMU-COLV) were established for 15, 30, 45, and 120 days after the first immunization. Morphological, histomorphometric, and immunohistochemical analyses were performed for smooth muscle α -actin (α -SMA), vimentin, VEGF, and caspase-3, biochemical measurement of 4-hydroxyproline, immunofluorescence (IF) for collagen I/III/V, and gene expression by qRT-PCR. Additionally, in the "in vitro" study, collagen I/III/V expression and α -SMA in dermal fibroblasts stimulated with Col V were analyzed. After induction of SSc, a significant increase in dermal thickening was observed between the IMU-COLV groups at 15 and 45 days, with increases in Col I and III in the IMU-COLV 120-day group. Col V increase was significant in

the IMU-COLV 45 and 120-day groups, as was the increased amount of 4-hydroxyproline in the IMU-COLV 45-day group. There was an increase in VEGF+ and caspase-3+ positive cells in the dermis of the IMU-COLV 45 and 120-day groups, and an increase in α -SMA+ positive cells in the dermis of animals in the IMU-COLV 120-day group, while vimentin positivity was not significant among the studied groups. The Col1a1 and Col3a1 genes showed no significant differences between groups, but Col5a1 and Col5a2 had higher expression in the IMU-COLV 15-day group. Additionally, positivity for Antinuclear Factor (ANF) was detected in the sera of animals from 30 days after immunization onwards. On the other hand, "in vitro", dermal fibroblasts stimulated with Col V showed altered fibrillogenesis and increased expression of Col I, Col III, Col V, and α -SMA. Therefore, this study showed that the IMU-COLV model develops skin fibrosis after 45 days of immunization with Col I, III, and large amounts of Col V. This study suggests that this change in fibrillar proportion may result not only from matrix protein activation mechanisms, such as Col V, but also from immune reactivity, leading to fibroblast differentiation and consequently altering collagen production, which is the main characteristic of SSc.

Keywords: Collagen V. Systemic sclerosis. Skin. Fibroblast. Experimental model. Fibrillogenesis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da esclerose sistêmica

A Esclerose Sistêmica (ES), é uma doença autoimune com características patogênicas distintas, compreendendo desarranjo vascular, reatividade imunológica e fibrose da pele e órgãos internos (1–3).

A pele é um dos órgãos mais afetados na ES, sendo o acometimento cutâneo caracterizado pelo espessamento e endurecimento, por excessiva deposição dos componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno (4). O grau de envolvimento da pele é o principal critério utilizado para a classificação da ES cutânea em limitada e difusa, tendo como base a extensão do acometimento cutâneo, além da associação a autoanticorpos e o padrão de órgãos envolvidos. Na ES cutânea limitada, os pacientes têm o espessamento cutâneo restrito às regiões distais, como mãos, antebraços, pés, face e pescoço, sem envolvimento do tronco. Já na ES cutânea difusa, os pacientes apresentam espessamento cutâneo envolvendo a região do tronco, usualmente peito, abdômen e costas. Ambas acometem órgãos internos como pulmões, rins, esôfago e coração, entre outros, porém, na ES cutânea difusa, o envolvimento desses órgãos ocorre mais precocemente e com maior frequência que na forma limitada (5,6).

Os fatores presentes nos primeiros anos da ES são preditivos para o desenvolvimento de manifestações pulmonares, cardiovasculares e renais. Pacientes com ES cutânea limitada têm sinais e sintomas não letais, como o fenômeno de Raynaud, ulcerações digitais, envolvimento gastrointestinal e desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar, e menor taxa de mortalidade e incidência de desenvolvimento de doença pulmonar intersticial grave. Já os pacientes com ES cutânea difusa, em estágio inicial têm uma rápida progressão do espessamento da pele, maior frequência de desenvolvimento de doença pulmonar intersticial, doença renal e envolvimento musculoesquelético. Tratamentos para ES podem ser um desafio, pois é uma doença altamente heterogênea, com manifestações clínicas variadas. Atualmente, têm sido utilizados antifibróticos, anti-inflamatórios e biológicos, como por exemplo o

nintedanib, tocilizumab e rituximade (7,8). Porém, novas estratégias terapêuticas são essenciais para prevenir o desenvolvimento do comprometimento de órgãos vitais em pacientes com ES.

A patogênese da ES é complexa e não está bem estabelecida. Uma interação entre eventos ambientais e fatores genéticos pode influenciar a suscetibilidade para desenvolver esta doença. Diversos estudos sugerem que a maioria dos genes de suscetibilidade para ES são haplótipos do antígeno leucocitário humano (HLA) e genes não relacionados ao sistema imunológico do HLA, que também servem como genes de suscetibilidade para outras doenças, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (9). Dentro da suscetibilidade genética, muitos gatilhos podem estar envolvidos na iniciação da doença, como exposições relacionadas ao trabalho com a poeira de sílica, cloreto de vinil e solventes orgânicos ou vírus e outros agentes infecciosos, que provavelmente desempenham um papel no desencadeamento da ES (9,10).

Sabe-se que o endotélio é alvo de uma agressão imune e inflamatória crônica, ocorrendo a ativação de células endoteliais e alteração do tônus vascular, resultando em lesão vascular. A evolução das lesões leva à rarefação capilar, espessamento da parede do vaso devido à proliferação de células da camada íntima e do músculo liso e, finalmente, estreitamento e obliteração do vaso, que resulta em isquemia tecidual, estresse oxidativo e disfunção orgânica. O aumento da permeabilidade vascular atrai células inflamatórias, que contribuem para o aumento da expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), culminando com o remodelamento vascular e fibrose tecidual (**Figura1**) (10,11).

O principal mediador vasoativo sintetizado pelas células endoteliais é a endotelina-1 (ET-1). A ET-1 é um peptídeo natural, com funções no desenvolvimento e regulação da fisiologia normal, desenvolvimento da função respiratória, homeostase cardiovascular e equilíbrio hidroeletrólítico. Na ES, a ET-1 pode causar efeitos de vasoconstrição, inflamação e fibrose causada por proliferação desordenada de fibroblastos. Outras importantes características da ET-1 são a adesão leucocitária e a capacidade de diferenciar fibroblastos em miofibroblastos (12).

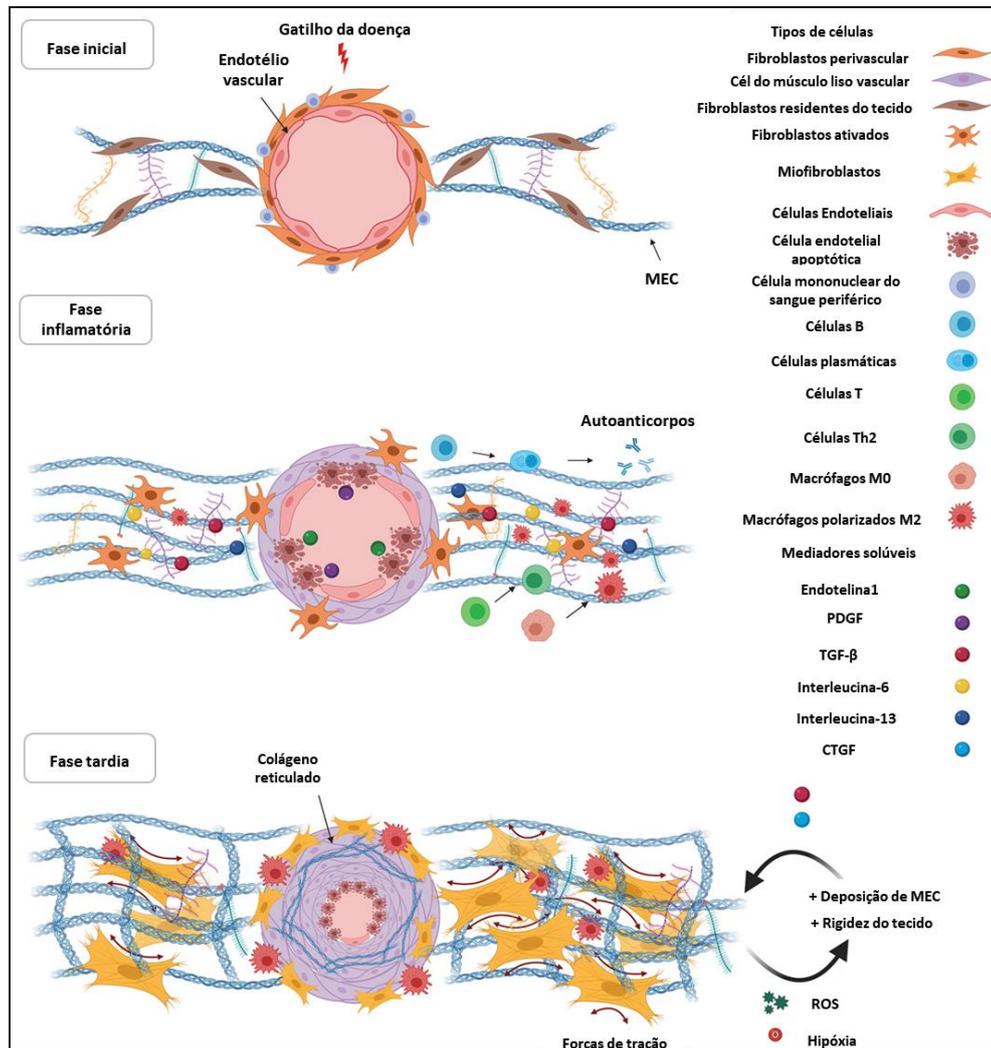


Figura 1 - Mecanismos moleculares da ES. Estágio pré-clínico: A lesão vascular é o evento inicial na ES e leva à ativação das células endoteliais e ao aprisionamento de células mononucleares do sangue periférico. Fase inflamatória: A injúria vascular progressiva causa apoptose das células endoteliais, que por sua vez secretam ET-1 e PDGF que estimulam a proliferação de células musculares lisas, levando ao estreitamento luminal e ao recrutamento de células inflamatórias. As células plasmáticas secretam autoanticorpos e IL-6. As células Th2 secretam TGF- β e IL-13, e os macrófagos M2 polarizados secretam TGF- β , contribuindo para a ativação dos fibroblastos e aumento da deposição da MEC. Fase tardia: A apoptose progressiva das células endoteliais, a proliferação de células musculares lisas e o estreitamento dos vasos levam à hipóxia tecidual e ao estresse oxidativo, que contribuem para a manutenção da fibrose. Os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos e aumentam a deposição da MEC levando ao estresse mecânico e perpetuando o processo fibrótico. Abreviações: MEC: matriz extracelular; ROS: espécies reativas de oxigênio; ET-1: Endotelina 1; PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF- β : Fator de crescimento transformante- β ; CTGF: Fator de crescimento do tecido conjuntivo. Adaptado de *DE PIERI et al., 2021*(10).

A desregulação da imunidade inata e adaptativa desempenham um papel importante na patogênese da ES. Anticorpos antinucleares (FAN) estão

presentes em até 95% dos pacientes com ES e os autoanticorpos específicos, como os anticentrômero, antitopoisomerase 1, e anti-RNA polimerase III, direcionados contra componentes nucleares intracelulares, estão presentes em mais de 75% dos pacientes. Além da presença de autoanticorpos, evidências de respostas imunes desreguladas são representadas por células inflamatórias e moléculas inflamatórias em tecidos-alvo, como a pele e os pulmões, e uma assinatura proeminente de interferon tipo I (IFN) em células imunes circulantes e infiltrados teciduais (10,11).

Na ES, a perpetuação do estímulo imunológico desencadeia um processo de remodelamento da MEC, que ativa os fibroblastos das áreas afetadas a produzirem quantidades elevadas de colágeno, sendo uma característica marcante desta enfermidade (13). Como em outras doenças fibroproliferativas, o fibroblasto se encontra permanentemente hiperativado, com expressão alterada de genes que determinam produção excessiva de MEC. Na ES, um dos mecanismos responsáveis por essa hiperativação é a mecanotransdução, em que fibroblastos e miofibroblastos seriam capazes de responder às forças tensionais, alterando sua sinalização intracelular em resposta ao estímulo, levando ao remodelamento alterado da MEC (14,15).

Os fibroblastos são células típicas do tecido conjuntivo responsáveis pela deposição de colágeno, necessário para a cicatrização (16). Esses se originam das células mesenquimais durante a vida embrionária e agem durante toda a vida do indivíduo, possuindo duas formas distintas de ativação: por via de sinalização parácrina e autócrina. A via parácrina é ativada pelos fatores de crescimento e citocinas produzidas por células inflamatórias, entre outras, como o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), as interleucinas 6 e 13 (IL-6 e IL-13) e os leucotrienos eicosanoides (moléculas derivadas do processo inflamatório), que podem atuar nos fibroblastos como fatores pró-fibróticos. Já a via de sinalização autócrina é ativada por citocinas produzidas pelos próprios fibroblastos, como o TGF- β (fator de crescimento transformador beta) e as interleucinas IL-1 β e IL-6. Ainda, os fibroblastos podem migrar para outras áreas em resposta a citocinas, além de responder a sinais químicos, que ativam a proliferação e diferenciação celular em miofibroblastos e a produção de

componentes da MEC como o colágeno, elastina, fibronectina e glicosaminoglicanos (1,17).

Os miofibroblastos são fibroblastos especializados, que adquirem características de células musculares lisas, incluindo a expressão de alfa actina do músculo liso (α -AML). Originam-se da diferenciação de diversas células, como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, pericitos, monócitos, células multipotentes e fibrócitos. Os miofibroblastos aparecem normalmente em resposta à cicatrização de lesões, sendo responsáveis pela deposição excessiva de colágeno durante o processo de cicatrização. Ao contrário do processo normal de cicatrização, no qual os miofibroblastos ocorrem apenas transitoriamente no tecido de granulação antes de sofrerem apoptose, os miofibroblastos na ES se tornam persistentes. Essas células contráteis secretam não apenas proteínas da matriz, mas também TGF- β e outros componentes profibróticos e, assim, promovem ainda mais a deposição e remodelação da MEC (18–20).

O TGF- β tem sido considerado uma das proteínas mais importantes na patogênese da ES, especialmente pela sua atividade pró-fibrótica (21,22). Alguns estudos relataram que os níveis de TGF- β estão aumentados na pele de pacientes com ES e que a assinatura gênica responsiva induzida por TGF- β aumenta fortemente na pele dos pacientes e correlaciona-se positivamente com a gravidade da doença (23,24). O TGF- β é secretado por diversas células, como os fibroblastos, miofibroblastos, células T, monócitos, macrófagos e plaquetas. É uma citocina que atua na regulação do crescimento, diferenciação e função de vários tipos celulares e, além da ES, está ligada a várias outras doenças fibróticas. Esse exerce a sua função por meio da ligação com o receptor específico (TGF β RII) na superfície de diversos tipos de células, provocando a fosforilação e ativação do receptor 1 de TGF- β (TGF- β RI). Por meio dessa ligação, inicia-se uma cascata de sinalização intracelular que resulta na expressão dos genes alvo, como o do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e colágeno tipo I, entre outros (4,25–27).

1.2. Colágeno

O colágeno é uma glicoproteína importante na matriz extracelular. É encontrado em quase todos os tecidos do organismo, sendo o responsável por grande parte das propriedades físicas teciduais. As moléculas de colágeno são formadas através do entrelaçamento de três cadeias α , em formato de tripla hélice helicoidal, estabilizadas por ligações de hidrogênio. O colágeno é denominado heterotrímero, quando as três cadeias α são diferentes, ou homotrímero, quando as três cadeias α são idênticas. Cada cadeia α é formada por várias sequências repetidas dos aminoácidos glicina, prolina e 4-hidroxiprolina. Até hoje, já foram descritos cerca de 28 a 30 tipos de colágeno, sendo divididos em subfamílias: os fibrilares, com tripla hélice ininterrupta (colágeno dos tipos I, II, III, V, XI, XXIV); os formadores de rede (colágeno dos tipos IV, VIII, X); os associados a fibrilas, com triplas hélices interrompidas (FACITs) (colágeno dos tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII); os associados à membrana e tripla hélice interrompida (XIII, XVII, XXIII, XXV); os formadores de fibrilas frisadas (VI); os MULTIPLEXINs (XV, XVIII) e os de ancoragem (VII) (28,29).

1.3. Biossíntese dos colágenos fibrilares

O colágeno da subfamília dos fibrilares é produzido sob a forma de pró-colágeno pelos fibroblastos, sendo a molécula transcrita inicialmente, denominada como pré-pró-colágeno. Este é transportado para dentro do retículo endoplasmático granular e apresenta peptídeos de sinal e de registro. Ainda no retículo endoplasmático granular são produzidas as cadeias α , através da hidroxilação e glicosilação da prolina e da lisina, que auxiliam na conformação da tripla hélice dessas cadeias por pontes de hidrogênio. Os pró-colágenos são, então, transportados para o aparelho de Golgi, onde ocorre a formação de cadeias dissulfídicas (S-S), sendo subsequentemente englobados por vesículas e secretados por exocitose. No espaço extracelular, ocorre a clivagem dos domínios amina (NH₃)- e carboxi (COOH)-terminais, pelas enzimas pró-colágeno peptidases, formando-se as moléculas de tropocolágeno. Estas se

agregam de modo a formar as fibrilas de colágeno, que, por reações bioquímicas, resulta na formação de ligações cruzadas, as quais conferem às fibrilas maior estabilidade (25,29).

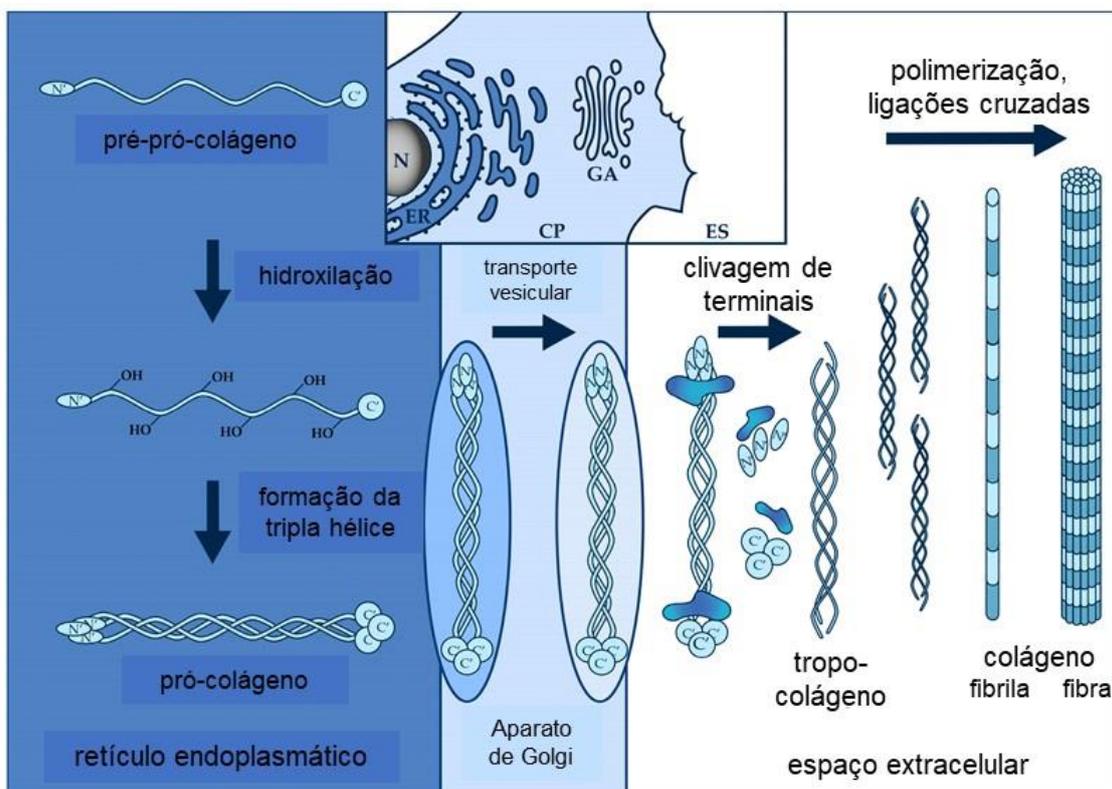


Figura 2 – Biossíntese e processo de maturação do colágeno. A seção central superior da figura mostra as organelas celulares com tons distintos de azul, envolvidas nas modificações pós-tradução do colágeno. Abaixo, a figura esquemática ilustra as etapas intra e extracelulares da formação das fibras de colágeno. N: núcleo, ER: retículo endoplasmático; CP: citoplasma; GA: aparelho de Golgi; ES: espaço extracelular. Desenho esquemático adaptado de Szász C, 2023 (30).

1.4. Colágeno na pele

A pele é estruturada em três camadas: epidérmica, dérmica e tecido adiposo subcutâneo (**Figura 3 A**). A epiderme, camada mais externa da pele, é composta por uma porção conjuntiva de origem ectodérmica e dois tipos celulares: as células basais e as escamosas. As células basais são produtoras de melanina, que fornecem pigmentação à pele. Ainda, na epiderme, são encontrados queratinócitos, que produzem a queratina. Abaixo da epiderme está a derme, que é dividida em subcamadas: papilar e reticular. A derme papilar, região que fica em contato com a epiderme, é constituída por tecido conjuntivo

frouxo e contém capilares que facilitam o transporte de nutrientes. A derme reticular é mais espessa do que a derme papilar, devido a densa concentração de fibras colágenas e reticulares, que estão entrelaçadas dentro dessa camada, dando resistência e elasticidade à pele. Ambas as camadas dérmicas abrigam fibroblastos, miofibroblastos e células imunes. Abaixo da derme, pode ser observado o tecido adiposo subcutâneo (**Figura 3 A**). Essa camada é composta por fibrócitos e adipócitos e é rica em proteoglicanos e glicosaminoglicanos. É a camada mais interna da pele e armazena energia, enquanto protege e isola termicamente o corpo (31).

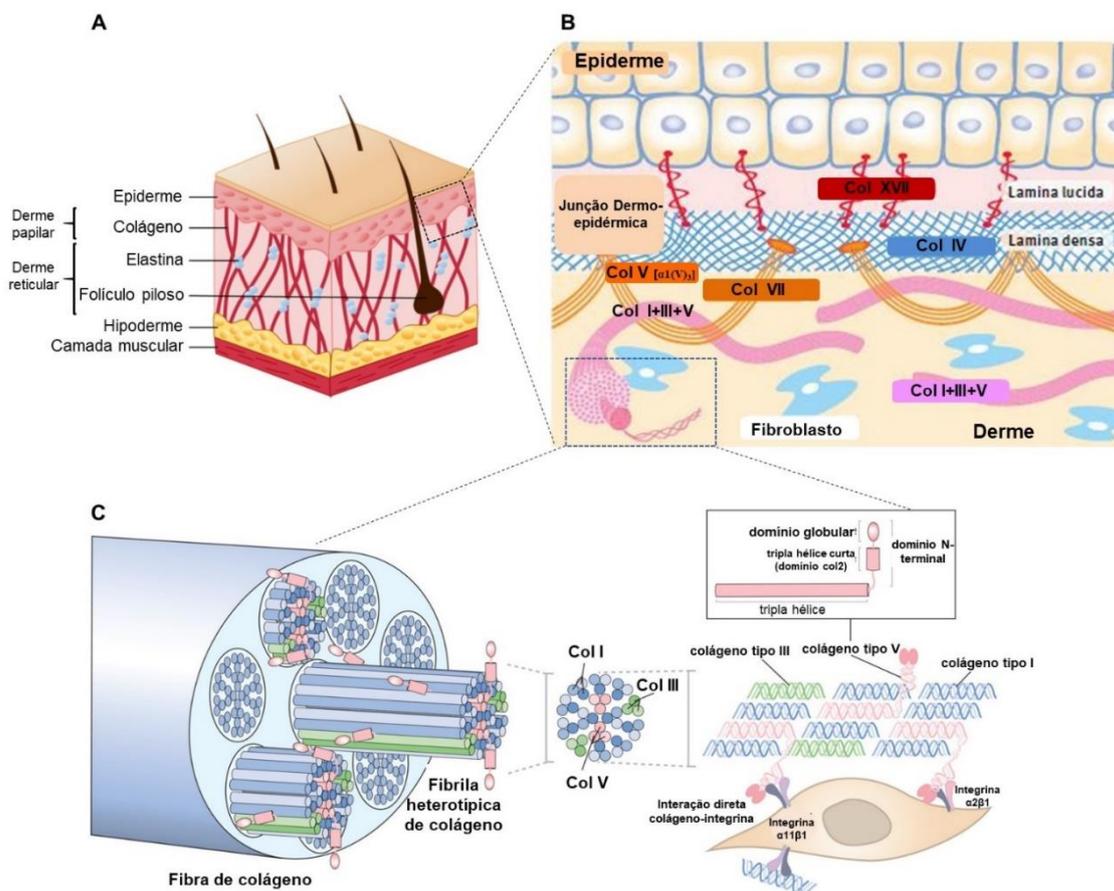


Figura 3 – Desenho esquemático da pele, dos principais tipos de colágeno e formação das fibrilas heterotípicas (Col I/III/V). **(A)** Representação das regiões e principais componentes da pele. **(B)** Distribuição dos tipos de colágeno na junção dermoepidérmica e derme. Na junção dermoepidérmica encontra-se a isoforma de Col V homotrímico $[\alpha 1(V)_3]$ e na derme o Col V heterotrímico $[\alpha 1(V)_2, \alpha 2(V)]$. **(C)** Colágeno V (rosa) em fibrilas heterotípicas, contendo colágeno I (azul) e III (verde). A porção fibrilar tripla helicoidal do Col V encontra-se oculta no interior das fibrilas de Col I e o domínio N-terminal, formado por um domínio globular e uma pequena tripla hélice, projeta-se na superfície da fibrila. O Col V desempenha um papel na nucleação da matriz de Col I, que também pode conter Col III. Os colágenos fibrilares são montados em microfibrilas, que se agregam para formar fibrilas e depois fibras. As integrinas de ligação ao colágeno na superfície celular podem potencialmente interagir com a curta tripla hélice, presente no domínio

N-terminal do Col V durante a formação de fibrilas. Col I: colágeno tipo I; Col III: colágeno tipo III; Col V: colágeno tipo V. Desenho esquemático adaptado de Hantae, 2021; Musiime, 2021 (32,33).

O colágeno é a mais abundante proteína fibrosa da pele. Os principais tipos de colágeno encontrados na pele são o tipo I (80-85%), o tipo III (10-15%) e pequenas quantidades de colágeno tipo V (2-5%) (**Figura 3 B**) (29). O colágeno do tipo I (Col I), pertencente ao grupo dos colágenos fibrilares, é mais espesso que os demais e é heterotrímero. É composto por duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$, codificadas a partir dos genes COL1A1 e COL1A2. É o colágeno mais abundante na pele e sua estrutura é semelhante a uma corda, com pouca ou nenhuma interrupção; possui papel importante como substrato na adesão celular e, também, participa do processo de migração, proliferação e diferenciação celular, em processos de remodelamento tecidual ou cicatrização. O Col I é reconhecido pelas integrinas e ativa proteínas celulares específicas, como a actina (34).

O colágeno do tipo III (Col III) é homotrímero, com as três cadeias $\alpha 1$ interligadas por pontes de sulfeto. Ele está localizado principalmente na região dérmica, onde forma pequenas fibras reticulares dando sustentação à pele; ainda, possui um alto teor de glicosilação e associa-se a glicoproteínas e proteoglicanos da matriz extracelular da pele (35).

O colágeno do tipo V (Col V) pertence ao grupo dos colágenos fibrilares e tem distribuição ubíqua, sendo encontrado na maioria dos tecidos conjuntivos. Está localizado principalmente entre a membrana basal e o tecido conjuntivo adjacente, em tecidos como o pulmão, pele, baço, córnea, fígado, rim, coração, entre outros (36,37).

Na pele, ainda podemos encontrar outros tipos de colágeno, só que em quantidades bem pequenas, como o colágeno dos tipos IV, VI, VII, XIV, XVI e XVII (**Figura 3 B**) (29).

1.5. Colágeno do tipo V

O Col V é formado por um domínio contínuo em tripla hélice (domínio helicoidal ou colagenoso) e dois globulares telopeptídeos terminais (NH3 e COOH) (38). Possui três isoformas, que se diferenciam pela composição de suas

cadeias. A heterotrímera constituída por três cadeias α distintas [$\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$], encontrada em placenta humana e bovina; a heterotrímera constituída por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ [$\alpha 1(V)_2$, $\alpha 2(V)$], encontrada em vários tecidos, como pele, pulmão, rim, entre outros; e ainda a homotrímera constituída por 3 cadeias $\alpha 1$ [$\alpha 1(V)_3$], presente no endométrio de camundongos e na região da interface dermo-epidérmica (39–41).

O Col V se copolimeriza com o colágeno dos tipos I e III, que estão presentes de forma abundante na pele, para formar as fibrilas heterotípicas (I/III/V) (42). Na formação das fibrilas heterotípicas, o domínio amino-globular terminal do Col V se projeta para fora das fibrilas de Col I/III (37,42). Este domínio globular do Col V confere a função de regular o diâmetro das fibras heterotípicas, impedindo fisicamente que novos monômeros se acrescentem à fibrila. Devido a esta característica, o Col V tem função importante na organização, crescimento e dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas, sendo atualmente considerado o nucleador da fibrilogênese do Col I (**Figura 3 C**) (32,43). Ainda, acredita-se que a região fibrilar do domínio globular N-terminal do Col V interage com integrinas, receptores presentes na superfície da célula, sendo importante para a fibrilogênese das fibrilas heterotípicas (Col I/V) (32).

Outra propriedade importante do Col V é a participação na adesão, migração e proliferação celular, devido em grande parte às suas sequências RGD (arginina, glicina e ácido aspártico), presentes em maior quantidade na cadeia $\alpha 2$ que na $\alpha 1$ (44). A adesão do Col V às células é mediada principalmente pelas integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$, que são e dependem da conformação em tripla hélice do colágeno (44,45).

A adesão do Col V às células pode também ocorrer independentemente das sequências RGD. Foi demonstrado que a porção tripla hélice da cadeia $\alpha 1$ do Col V possui um fragmento de 30 Kd, que contém um agrupamento de resíduos de aminoácidos básicos, com grande afinidade à heparina e sulfato de heparina (46,47). Deste modo, o sítio do Col V ligante da heparina, interage com os proteoglicanos com sulfato de heparina na superfície das células, desencadeando sinais de estimulação celular.

Uma outra característica peculiar do Col V em relação aos outros tipos de colágeno é o fato de possuir propriedades imunogênicas, antigênicas e pelo

potencial de tornar-se um autoantígeno quando exposto, pela ação de metaloproteinases ou outros agentes indutores da lesão endotelial crônica (48–50). Nos últimos anos, a literatura científica tem destacado a importância do Col V em vários processos patológicos, como rejeição de transplante de pulmão em modelo experimental e em humanos, fibrose pulmonar idiopática, asma de hipersensibilidade e aterosclerose, além da ES (49,51–55). Ao contrário, a indução de tolerância oral/nasal com o Col V preveniu o desencadeamento desses processos patológicos em modelos experimentais (48,50,52,53,56–59). Estudos recentes mostraram que a autoimunidade para o Col V é dirigida principalmente para a cadeia $\alpha 1$ (59–62).

Além disso, foi identificado no pulmão e pele de pacientes com ES um aumento na expressão de Col V e do gene COL5A2 (54,63). Ainda, foi mostrado que a expressão do gene COL5A2 e da cadeia $\alpha 2(V)$ na pele estão aumentados nas fases mais precoces da ES e o aumento do depósito na derme dos pacientes se correlaciona com o espessamento da pele e com a gravidade da doença (54,64).

1.6 Modelos experimentais de Esclerose Sistêmica

Atualmente, estão disponíveis vários modelos animais que têm sido amplamente utilizados para estudar os mecanismos envolvidos na patogênese da ES e novas estratégias terapêuticas.

Ao longo dos anos, muitos modelos animais de ES foram desenvolvidos através da administração exógena de agentes indutores de fibrose, manipulação genética da sinalização relacionada à fibrose, entre outras (**Tabela 1**).

Estudos realizados no nosso laboratório demonstraram um modelo animal, inicialmente desenvolvido em coelhos fêmeas da linhagem Nova Zelândia e, mais recentemente, em camundongos C57BL/6, que desenvolvem alterações histológicas, vasculares e imunológicas semelhantes à ES em humanos, através da imunização com colágeno tipo V (Col V) (65–69). Os coelhos apresentaram depósito de colágeno na derme superficial e profunda, atrofia dos anexos cutâneos e uma redução do tecido adiposo. As alterações desenvolvidas nesses animais não foram restritas só a pele, mas também

apresentaram fibrose pulmonar, alterações cardíacas, esofágicas e ao redor dos vasos do interstício renal (70). Ainda, os animais apresentaram imunocomplexos e anticorpos anti-Scl-70 e anticorpos anticolágeno dos tipos I, III e IV no soro.(68) As alterações morfológicas foram observadas a partir do sétimo dia da imunização com Col V. Não foram observadas alterações quando os animais eram imunizados com outros tipos de colágeno, mesmo os colágenos que aparecem aumentados na doença em humanos, como o Col I e Col III, o que reforça a ideia de que o Col V é capaz de induzir um modelo experimental de ES e pode atuar como um autoantígeno na doença (71).

O modelo atual em camundongo C57BL/6 (IMU-COLV) também apresenta remodelamento cutâneo, mecânica pulmonar anormal, aumento de genes que codificam as cadeias do Col I, III e V, vasculopatia com fortes sinais de aumento na expressão de ET-1, VEGF e caspase-3, autoimunidade com FAN positivo, além de autoanticorpos anti-Col III e anti-Col IV (69) **(Tabela 1)**.

Ainda, a indução de ES em camundongos com bleomicina é um dos modelos mais utilizados para o estudo de fibrose cutânea. A bleomicina é um antibiótico glicopeptídico, originalmente isolado do fungo *Streptomyces verticillus*. Este exerce efeitos sobre as células endoteliais, imunológicas, fibroblastos e queratinócitos; além disso, aumenta a expressão dos genes das proteínas da MEC e de citocinas fibrogênicas, que podem contribuir para a indução da fibrose (13). Yamamoto e colaboradores estabeleceram um modelo murino para fibrose da pele, por injeções subcutâneas diárias de bleomicina, durante um período de 4 semanas (72). Nesse modelo, as alterações cutâneas são geralmente localizadas na área ao redor do local da injeção e permanecem pelo menos 6 semanas após a interrupção das injeções de bleomicina (13) **(Tabela 1)**.

Nos últimos anos, novos modelos em animais foram estabelecidos com espécies reativas de oxigênio (EROs). Um exemplo de modelo é a injeção subcutânea com ácido hipocloroso, que induz fibrose cutânea e pulmonar. A exposição a essas moléculas oxidativas desencadeia uma resposta autoimune sistêmica, caracterizada pela detecção de anticorpos anticentrômero (ACA) e antitopoisomerase I (ATA) (73–76) **(Tabela 1)**.

Ainda, a administração subcutânea de angiotensina II também pode ser usada na indução da ES, pois induz a constrição vascular levando à inflamação e fibrose. A angiotensina II exógena aumenta a produção de colágeno tipo I e TGF- β pelos fibroblastos, o que resulta em fibrose similar à ES (75,77). Muitos estudos demonstram que o anticorpo anti-Scl-70 no soro está relacionado com o acometimento da pele, aumento de citocinas inflamatórias e fibrose pulmonar. Por isso, foi desenvolvido um modelo de ES pela injeção subcutânea quinzenal de topoisomerase I de DNA e adjuvante completo de *Freund*, mostrando que a imunização com topoisomerase I pode induzir fibrose dérmica e pulmonar com resposta imune Th2 / Th17, semelhante à ES (75).

Modelos animais genéticos desenvolvem espontaneamente mutações no genoma com manifestações semelhantes às da ES (10). Um dos modelos animais genéticos mais bem caracterizados da ES são os camundongos *tight skin* tipo 1 (TSK-1). O camundongo TSK-1 é um modelo resultante de uma duplicação parcial do gene da fibrilina-1, que é uma proteína estrutural da MEC e o principal componente das microfibrilas. Camundongos heterozigotos TSK-1 desenvolvem características semelhantes a ES, como a fibrose cutânea, a ativação de células B, acompanhada da produção de autoanticorpos e a ativação de vias moleculares profibróticas (78,79) (**Tabela 1**). Outra mutação descrita é a do camundongo *tight skin* tipo 2 (TSK-2), induzida pela administração do agente mutagênico *Ethylnitrosourea*, o qual induz mutação na cadeia alfa do colágeno tipo III. Os camundongos TSK-2 desenvolvem fibrose dérmica, depósito de colágeno na pele e autoanticorpos, porém não foi relatada fibrose em outros órgãos (77,80).

Ainda, foram desenvolvidos modelos genéticos como o fator *Friend leukemia integration 1* (Fli1) e o fator *Kruppel-like 5* (KLF5). O Fli1 é um membro da família do fator de transcrição Ets e o KLF5 é um regulador transcricional, com papéis demonstrados na fibrose do rim e do coração. O Fli1 é um potente inibidor da expressão do gene do colágeno tipo I, através da sinalização de TGF- β . O Fli1 é expresso em células de linhagens endoteliais e hematopoiéticas e participa na regulação do desenvolvimento e diferenciação dessas células. Os camundongos com deficiência heterozigótica de Klf5 e Fli1 (Klf5 +/-, Fli1 +/-) desenvolvem fibrose cutânea, vasculopatia obliterativa e autoanticorpos.(78)

Outro modelo é o antígeno 2 relacionado com *Fos* (*Fra-2*), um membro da família Fos-AP1 de reguladores transcricionais. Os camundongos transgênicos *Fra-2* apresentam apoptose das células endoteliais dérmicas, rarefação dos capilares da pele, bem como fibrose da pele e pulmão (81).

Tabela 1- Modelos experimentais de ES

Modelo	Fibrose	Vasculopatia	Inflamação	Autoimunidade	Referência
BLM	+	±	+	ANA	(72)
EROs	+	-	+	ACA, ATA	(73,74)
Angiotensina II	+	-	+	-	(82)
IMU- COLV	+	+	-	ANA, Anti-Col III, Anti-Col IV	(69)
Topo I	+	-	+	ATA	(83)
ScI-GVHD	+	±	+	ANA	(84)
TSK-1	+	-	-	ANA, ATA, Anti-DNA	(85)
TSK-2	+	-	+	ANA, ATA, ACA, Anti-DNA	(86)
Fli1+/- Klf5 +/-	+	+	+	ANA	(87)
Fra-2	+	+	-	-	(88)
Caveolina-1	+	+	±	-	(89)
uPAR	+	+	-	-	(90)

BLM: modelo de camundongo induzido por bleomicina; EROs: espécies reativas de oxigênio; FRA-2: Antígeno 2 relacionado ao fator de transcrição; Topo I: Anti -topoisomerase I; ScI-GVHD: doença esclerodermatosa do enxerto contra o hospedeiro; Fli-1 +/- klf5 +/-: *fator Friend leukemia integration -1 I* (Fli1)/fator Kruppel-like 5 (*KLF5*); FRA-2: Antígeno 2 relacionado com Fos 2; uPAR: receptor do ativador do plasminogênio tipo uroquinase; ANA: Anticópos antinucleares; ATA: Anticópos anti-topoisomerase-I; ACA: Anticópos anticentrômero.

2. JUSTIFICATIVA

Até o momento, observamos que a imunização com Col V em camundongos C57BL6, desencadeia alterações morfológicas, imunológicas e vasculares na pele semelhantes às encontradas em pacientes com ES (67,68,71,91)., Nossa hipótese é que estas alterações sejam possivelmente desencadeadas pelo depósito de imunocomplexos circulantes (colágeno V - anticolágeno V) na superfície endotelial. Esse depósito causa lesão endotelial, expondo o Col V localizado logo abaixo da membrana basal, anteriormente oculto. Essa exposição atua como um neoantígeno, contribuindo para o processo inflamatório e caracterizando a autoimunidade (68,91). Entretanto, até o momento, não se conhece exatamente os mecanismos de ação do Col V sobre a indução da fibrose tecidual, bem como as alterações cutâneas durante a evolução deste modelo experimental.

A importância do Col V na ES em humanos tem sido demonstrada nos últimos anos, considerando que o aumento na expressão de Col V na pele e pulmão dos pacientes e, ainda, o aumento do gene COL5A2 e da cadeia $\alpha 2(V)$ na pele e pulmão, nas fases iniciais da doença, correlacionaram-se com a gravidade da doença (54,63,64,67,92,93). Além disso, em culturas de fibroblastos de pacientes com ES foi observado um aumento na expressão do Col V, com fibrilas anormalmente finas e distorcidas, formando agregados densos (54). Esses achados, junto ao fato de que a tolerância nasal com Col V no modelo experimental de ES diminui o processo inflamatório e fibrótico no pulmão e pele, além de diminuir a expressão de TGF- β , fornecem mais evidências de que o Col V desempenha um papel na patogênese da ES como um neoantígeno desencadeante de resposta autoimune (91,94).

Já foi mostrado que aos 120 dias de imunização, o tecido cutâneo nos camundongos do modelo IMU-COLV, apresenta um padrão histológico com espessamento, retificação epidérmica, diminuição da derme papilar e anexos atrofiados, além de aumento da expressão dos genes que codificam o Col V, *Col5a1* e *Col5a2*. Ainda, anticorpos anticolágeno III e IV e FAN foram detectados nos soros dos camundongos (69).

Entretanto, o conhecimento do mecanismo que desencadeia o acometimento cutâneo e quando se inicia, ainda não foi determinado no modelo IMU-COLV, assim como o mecanismo que leva aos animais desenvolverem alterações semelhantes a doença em humanos. Para atingir nossos objetivos realizamos um estudo temporal do tecido cutâneo, para entender a fisiopatologia da fibrose cutânea no modelo IMU-COLV. Ainda, devido as características funcionais e moleculares do Col V, foi analisado o envolvimento dessa proteína na patogênese da ES e, possivelmente, na ativação dos fibroblastos nessa enfermidade.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

A proposta deste estudo foi avaliar a constituição e desenvolvimento da fibrose cutânea, em camundongos C57BL/6, após 15, 30, 45 e 120 dias de imunização com Col V. Ainda, caracterizar “*in vitro*” a fibrilogênese, após a ativação de fibroblastos dérmicos com Col V. Para isso foram realizadas após 15, 30, 45 e 120 dias de imunização com Col V:

Análise “*in vivo*”

- Estudo temporal qualitativo e quantitativo das alterações histológicas da pele, avaliação da composição da matriz fibrilar da pele durante o desenvolvimento da fibrose.
- Análise bioquímica do colágeno total da pele, através da 4-hidroxi prolina.
- Análise do fenótipo celular dos fibroblastos e miofibroblastos na pele após 15, 30, 45 e 120 dias de imunização com Col V.
- Avaliar a presença de ativação endotelial e apoptose através da positividade para VEGF e Caspase-3.
- Avaliar o perfil molecular dos genes para as cadeias dos colágenos dos tipos I, III e V.

Análise “*in vitro*”

- Avaliar a síntese dos colágenos fibrilares I, III e V, α -AML em fibroblastos dérmicos, após 120 dias de imunização.
- Analisar a síntese dos colágenos fibrilares I, III e V, α -AML em fibroblastos de pele de animal controle estimulados com Col V.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para este estudo, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (n=72), com 2 meses de idade e cerca de 20 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP (CEUA-FMUSP N° 1416/2019; 1543/2020).

Os animais foram mantidos no Biotério de Manutenção e Experimentação da Clínica Médica, em caixas padrão para camundongos, acondicionados 5 animais por caixa. Estes permaneceram em ambiente com luz controlada claro/escuro (12/12 h), sistema de climatização com regulagem de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e receberam água filtrada e ração peletizada convencional “*ad libitum*”.

4.2 Protocolo Experimental

4.2.1 Indução de Esclerodermia Experimental

Os camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram imunizados, por via subcutânea, com 150 µg de Col V de placenta humana (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA), diluído em 200 µl de ácido acético 10 mM, pH 6,0 e emulsificado em igual volume de adjuvante completo de *Freund* (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA). No vigésimo e no trigésimo quinto dia após a primeira imunização (IMU-COLV), os camundongos receberam dois reforços, por via intramuscular, com 150 µg/200 µl de Col V, emulsificado em igual volume de adjuvante incompleto de *Freund*, no vigésimo e no trigésimo quinto dia após a primeira imunização (IMU-COLV) (**Figura 2**). Para avaliação das alterações cutâneas em fases iniciais e na progressão da ES experimental, foram estabelecidos os grupos, de acordo com o tempo após a primeira imunização com Col V: IMU-COLV 15 dias (n=10); IMU-COLV 30 dias (n=10); IMU-COLV 45 dias (n=10) e IMU-COLV 120 dias (n=10) (**Figura 2**).

Considerando o protocolo de indução de ES, o grupo de 15 dias foi submetido apenas a primeira imunização, o grupo de 30 dias foi submetido à imunização e um reforço e os grupos de 45 dias e 120 dias receberam todas as doses (imunização e os dois reforços) de Col V (**Figura 2**). Os animais controles (n=32) foram imunizados apenas com adjuvante completo ou incompleto de *Freund*, diluído em 200 µl de ácido acético 10 mM, seguindo o mesmo protocolo e grupos (15, 30, 45 e 120 dias) dos animais imunizados (**Figura 2**). Para minimizar reações indesejadas, o volume de 200 µl da emulsão de Col V e adjuvante foi dividido à metade e aplicado em dois pontos no dorso dos animais, para a administração subcutânea, e em ambos os músculos quadríceps, para a intramuscular. A utilização das vias subcutânea e intramuscular para imunização com o Col V em murinos, permite obter um padrão de resposta inflamatória similar ao que foi observado em publicações prévias do nosso grupo, nas quais a ES experimental foi induzida em coelhos (67,95) e camundongos C57BL/6 (69). Uma hora antes das imunizações, os animais dos grupos IMU-COLV 15, 30, 45 e 120 dias e os respectivos controles foram submetidos à analgesia preventiva com cloridrato de tramadol, por via subcutânea (40 mg/Kg de peso corporal). Para as imunizações, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar® - 50 mg/Kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (Rompum® - 10 mg/Kg peso corporal). Injeção subcutânea de cloridrato de tramadol (40 mg/Kg de peso corporal) foi mantida a cada 12 h durante 96 h após as imunizações. Ainda, foi adicionado um grupo de camundongos fêmeas C57BL/6 (n=5), sem nenhuma imunização ou manipulação.

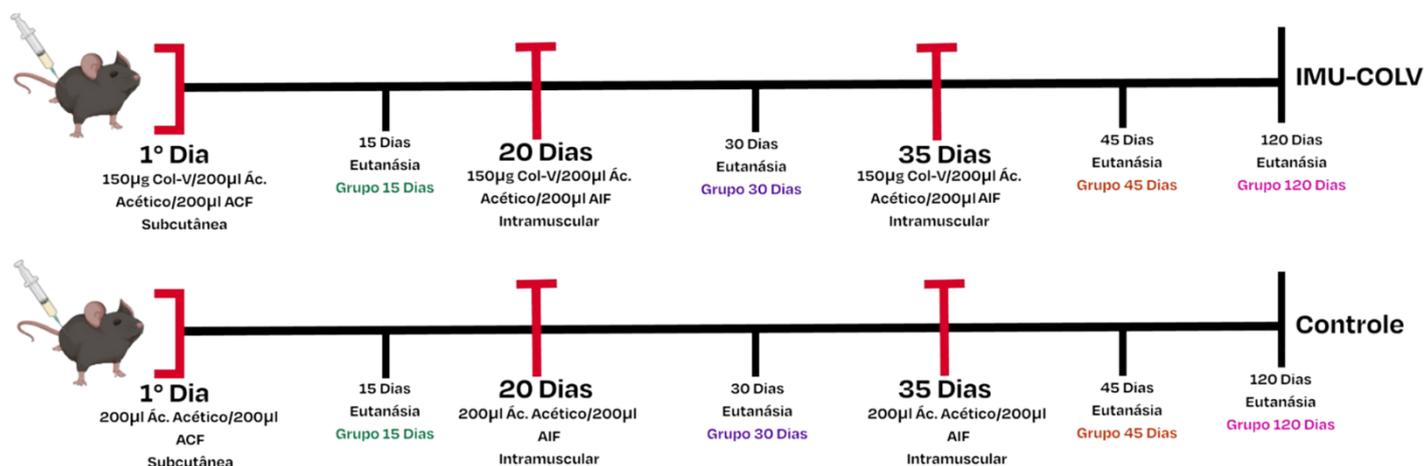


Figura 4 - Esquema do protocolo de imunização com Col V para a indução do modelo de ES em camundongos C57BL/6 e controles. Grupos de estudo foram submetidos à eutanásia a 15, 30, 45 e 120 dias IMU- COLV: imunizado com Col V.

4.3. Coleta do soro

Após os períodos estabelecidos, os animais foram submetidos à eutanásia por injeção intraperitoneal sobre dose anestésica (associação de cloridrato de cetamina - Ketalar® - 300 mg/Kg de peso corporal – e cloridrato de xilazina - Rompum®- 30 mg/Kg peso corporal). Logo após a eutanásia, foi acessada a cavidade torácica para coleta de sangue por secção da artéria aorta. O sangue foi mantido à temperatura ambiente, por cerca de 60 minutos, e centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos, para a separação do soro, que foi mantido a -20°C até a realização dos ensaios imunológicos.

4.4. Coleta da pele

As amostras de pele foram coletadas da região dorsal dos animais, evitando-se as regiões onde foi realizada a imunização subcutânea. Os fragmentos foram imersos em solução de formol a 10% para as análises morfométricas e de imuno-histoquímica.

4.5. Análise morfológica da pele

Para a análise histológica, as amostras de pele embebidas em parafina foram cortadas em micrótomo, numa espessura de 3-4 μm , e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Masson.

4.6. Avaliação da espessura da pele

A avaliação da espessura dérmica foi realizada por análise de imagem, em cortes histológicos da pele corados com H&E. O sistema de análise de imagem consiste em uma câmera CCD Sony acoplada ao microscópio Olympus BX-51, a qual captura as imagens e as envia para o monitor por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc. St. Laurent, Quebec, Canadá). As imagens foram digitalizadas em um aumento de 200X e processadas pelo software *Image-Pro Plus 6.0®*. Cinco linhas verticais foram traçadas entre a junção dermoepidérmica até a camada de adipócitos, partindo de um ponto central do tecido e 150 μm à direita e à esquerda. A partir da média aritmética das linhas traçadas foi calculada a espessura da pele em μm^2 (96).

4.7. Imunofluorescência para o colágeno dos tipos I, III e V

Para a imunodeteção do colágeno dos tipos I, III e V, cortes de 3-4 μm de amostras de pele foram aderidas em lâminas com *3-aminopropiltriethoxy silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Os sítios imunogênicos foram expostos pelo tratamento enzimático das amostras de pele com pepsina bovina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA), na concentração de 8 mg/ml em ácido acético 0,5 N, com pH 2,2, por 30 min, a 37°C. Após sucessivas lavagens com tampão fosfato, pH 7,0 (PBS), as lâminas foram incubadas em 5% de albumina bovina (BSA) diluída em PBS. As lâminas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com os anticorpos policlonais de coelho anticolágeno tipo I (1:50; Rockland), anticolágeno tipo III (1:50; Rockland) e anticolágeno tipo V (1:800) (66), diluídos em PBS. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 3 vezes (10 min) em PBS com 0,05% Tween 20 e incubadas por 1 hora com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho ALEXA 488 (Invitrogen, Life Technologies), diluído 1:200 em PBS, contendo 0,006% de azul de Evans. As lâminas foram novamente

lavadas em PBS 0,05% Tween 20 e montadas com glicerina tamponada para a análise em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co. Tokyo, Japão).

4.8. Análise morfométrica do colágeno I, III e V por análise de imagem

As lâminas imunomarcadas com colágeno dos tipos I, III e V foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japão) e quantificadas por um sistema de análise de imagem. As imagens foram processadas por um software *Image-Pro Plus 6.0*. As amostras de pele foram analisadas às cegas, sendo selecionados aleatoriamente 10 campos, num aumento de 400x, para as seguintes regiões: derme papilar e derme reticular. A área total do tecido analisado em cada campo foi medida pelo software *Image-Pro Plus 6.0*. O colágeno presente nos campos adquiridos foi avaliado através da seleção da tonalidade verde fluorescente, correspondente a cada colágeno imunomarcado. A área imunomarcada foi dividida pela área total de tecido analisado e o resultado expresso em porcentagem.

4.9. Colocalização dos colágenos I, III, V e α - AML por imunofluorescência

Para identificar a expressão do colágeno dos tipos I, III, V e α -AML, os cortes de 3-4 μ m de amostras de pele foram desparafinizadas e as lâminas foram imersas em xilol aquecido a 60°C, por cerca de 30 minutos, e dois banhos de 10 minutos em xilol à temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-70%), seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos, um banho em água destilada e 15 minutos em PBS, pH 7,5. A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada com pepsina bovina (Sigma Chemical Co.; USA), na concentração de 4 mg/ml em tampão glicina 0,01 N, pH 2,2 por 30 min, a 37°C. Ao término desta incubação, os cortes foram lavados com PBS por três vezes de 10 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com um ciclo de 4 lavagens de 5 min com água oxigenada 0,3%, seguido de água corrente, água

destilada e, por último, as lâminas foram colocadas em tampão PBS com Tween 20, por 5 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram incubadas por uma noite a 4°C, com os anticorpos policlonais de cabra anti-colágeno do tipo I (1:1500), de coelho anti-colágeno do tipo III (1:100), de coelho anti-colágeno tipo V (1:300) e anticorpo monoclonal de camundongo anti α -AML (1:30), diluídos em PBS. Após esse período, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS/Tween 20 0,05%, por três vezes de 10 minutos, e incubados por 60 minutos à temperatura ambiente com os anticorpos conjugados anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (verde) / anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 546 (vermelho) (Invitrogen, Life Technology, EUA), diluídos 1:200 em PBS. A marcação dos núcleos das células foi realizada pela incubação com DAPI (Abcam, Cambridge, UK), por 5 minutos. Os cortes foram novamente lavados com PBS com Tween 20 0,05%, montadas com solução de glicerina tamponada e analisados em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan).

4.10. Imuno-histoquímica para α -AML, Vimentina, VEGF e Caspase-3

A imuno-histoquímica foi realizada para avaliação de α -AML através do método da biotina-estreptoavidina-peroxidase. Resumidamente, os cortes de pele de 3-4 μ m foram desparafinizadas e bloqueadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3%, com um ciclo de 4 lavagens de 5 minutos para inibir a atividade da peroxidase endógena. Os anticorpos utilizados nas reações foram o anticorpo monoclonal de camundongo α -AML (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA) e os anticorpos policlonais de coelho anti-Vimentina (1:400; Cell Singaling Technology, EUA), VEGF (1:400; Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA) e caspase-3 (1:3000; Novus Biologicals, EUA). A recuperação antigênica foi realizada com pepsina bovina (Sigma Chemical Co.; EUA), na concentração de 4 mg/ml em tampão glicina 0,01 N, pH 2,2, por 30 min, a 37°C (α -AML). Alternativamente, a recuperação antigênica foi realizada com solução de tampão citrato pH 6,0 (vimentina, VEGF e caspase-3) em alta temperatura, 125°C por 1 minuto, em panela de pressão (Pascal). Os cortes foram incubados com o anticorpo primário durante a noite a 4° C. A reação foi

revelada com um kit de biotina-estreptoavidina-peroxidase, de acordo com as instruções do fabricante. A 3,3 diaminobenzidina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) foi utilizada como cromogênio. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha, HE). Para os controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

4.11. Quantificação de α -AML, Vimentina, VEGF e Caspase-3

Para análise das células imunomarcadas, o parâmetro utilizado consistiu na positividade da marcação, sendo consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada no citoplasma, independente da intensidade. Foi utilizado o sistema de análise de imagem (*Image-Pro Plus 6.0*). Dois observadores, sem o conhecimento prévio dos casos, avaliaram 6 campos do tecido cutâneo, num aumento de 1000x. A expressão de α -AML, vimentina, VEGF e caspase-3 foi determinada de acordo com o número de células positivas, sendo expressas como uma porcentagem de células totais no campo analisado (96).

4.12. Cultura de fibroblastos cutâneos

O método de “*explant*” foi realizado para o cultivo de fibroblastos provenientes de biópsias de pele de camundongos C57BL/6 imunizados com Col V (IMU-COLV 120 dias) e de animais controles. As amostras de pele foram desinfetadas com álcool 70% e após a desinfecção, os fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri e cortados, com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, em fragmentos de aproximadamente 1 mm². As células foram cultivadas em placa de Petri com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Gibco: 12800-017), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL - (Sigma-Aldrich, EUA) e estreptomicina (100 µg/mL - (Sigma-Aldrich, EUA). A placa de Petri com os fragmentos foi mantida em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Foi realizado o acompanhamento diário para registro morfológico e observação das células. A substituição do meio de cultivo foi realizada a cada 72 horas. Após a confluência celular de 80%, foram

realizados procedimentos enzimáticos padrão com tripsina-EDTA 0,05% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), para a transferência das células para garrafas de 75 cm², contendo meio DMEM-Supl. Novamente, a cultura foi mantida em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Essas células foram utilizadas na expansão das culturas e/ou na execução dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados com as células na terceira passagem (p3).

4.13. Detecção de colágeno dos tipos I, III e V e α -AML em fibroblastos dérmicos do IMU-COLV

Os fibroblastos cutâneos (1×10^5), dos animais do grupo IMU-COLV 120 dias, foram cultivados em lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro, colocadas dentro de placas de 24 poços (Costar, Cambridge, USA), contendo meio de cultura DMEM (Gibco Life Technologies; Invitrogen, Paisley, UK), suplementado com 20% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. Foram realizadas duplicatas de cada caso, sendo as culturas mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ até atingirem a confluência de 80-90%. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com 250 μ l de DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*), seguido de fixação em 4% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich P-6148, EUA), por 2 horas a 4°C. Após esse período, as células foram submetidas a um novo ciclo de três lavagens com DPBS. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com BSA 5% (Sigma Aldrich A9418, USA), por 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram incubadas durante a noite a 4°C, com os anticorpos policlonais de coelho anticolágeno III (1:200; Rockland) e anticolágeno V (1:100; Rockland), anticorpo policlonal de cabra anticolágeno I (1:1.500; Rockland) e o anticorpo monoclonal de camundongo anti α -AML (1:100; Santa Cruz) diluídos em PBS. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em PBS com Tween20 0,05% e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente, com os respectivos anticorpos conjugados anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen), anti-IgG de cabra Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen) e anti-IgG de camundongo Alexa Fluor (1:200; Invitrogen), diluídos em azul de Evans 0,006%. A marcação dos núcleos das células foi realizada

pela incubação com DAPI (Abcam, Cambridge, UK) por 5 minutos. Após sucessivas lavagens em PBS com Tween20 0,05%, as lamínulas foram montadas, com solução de glicerina tamponada, em lâminas lisas lapidadas (EasyPath, São Paulo, BR) e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japão).

4.14. Detecção de colágeno dos tipos I, III e V e α -AML em fibroblastos cutâneos de animal controle estimulados com Col V

Os fibroblastos cutâneos (5×10^4 células/cm²) dos animais sadios foram transferidos para uma microplaca preta, de fundo chato de 96 poços (Corning 3599), em duplicatas. Após atingirem a confluência de 80-90 %, as células foram incubadas com diferentes concentrações de Col V (25 μ g/mL, 50 μ g/mL e 100 μ g/mL), pelos períodos de 24 e 48 horas. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com 100 μ l de DPBS, seguido de fixação em 4% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich P-6148, EUA), por 2 horas a 4°C. Após outro ciclo de lavagens com DPBS, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1% (Sigma Aldrich 93443, EUA) a 4°C por 15 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com BSA 5% (Sigma Aldrich A9418, EUA) por 40 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, as células foram incubadas por 16 horas com os anticorpos policlonais de coelho anticolágeno III (1:200; Rockland), anticolágeno V (1:100; Rockland) e de cabra anticolágeno I (1:1.500; Rockland) e o anticorpo monoclonal de camundongo anti α -AML (1:100; Santa Cruz) diluídos em BSA 5%. Posteriormente, as células foram incubadas por duas horas, em temperatura ambiente, com os respectivos anticorpos conjugados anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen), anti-IgG de cabra Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) e anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 488 1:500; Invitrogen) com 0,1 μ g/ml de *Hoechts* 33342, para marcação dos núcleos. Finalmente, após novo ciclo de lavagens com DPBS, as intensidades de fluorescência das reações foram visualizadas usando o *ImageXpress Micro High Content System*. A intensidade de fluorescência nas células e a porcentagem de células positivas foram determinadas utilizando o software *Cell Scoring MetaExpress*.

4.15. Quantificação de colágeno pela dosagem da 4-hidroxirolina

A dosagem da 4-hidroxirolina foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Bergmann e Loxley (1963), que envolve quatro processos: hidrólise ácida, neutralização, oxidação e coloração. As amostras de tecido cutâneo dos animais dos grupos IMU-COLV e controles foram pesadas antes e após a liofilização, realizada a -50°C por cerca de 20 horas. Os tecidos liofilizados foram solubilizados em HCl 6N em tubos pirex, resistentes a alta temperatura, e mantidos durante 22 horas a 100°C , para a hidrólise ácida. As amostras hidrolisadas foram filtradas e 1 ml do filtrado foi neutralizado (pH entre 6,5 e 7,0), com solução 100% saturada de hidróxido de lítio. Posteriormente, em 1 ml de amostra com pH neutro, foi adicionado 2 ml de isopropanol e 1 ml de solução oxidante, contendo cloramina T 7%. Essa mistura foi mantida por 4 minutos em temperatura ambiente, para que ocorra a reação de oxidação. Logo após, para o desenvolvimento da reação colorimétrica, foram adicionados 2 ml do reagente de Ehrlich (ácido perclórico, álcool isopropílico e 4-dimetilaminobenzaldeído) à amostra oxidada, mantendo-se os recipientes vedados em banho maria a 60°C por 20 minutos. Foram preparadas 2 soluções-padrão para o controle de cada ensaio: 1. Solução padrão de 4-hidroxirolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), na concentração de $4\ \mu\text{g/ml}$, dissolvida em 1 ml de água destilada; 2. Controle branco: 1 ml de água destilada. A estas soluções foram acrescentados os mesmos reagentes utilizados nas amostras, nas mesmas proporções e condições. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 560 nm. Como controle de qualidade da reação, foi utilizado um fator (F), com variação entre 9 e 13, calculado pela divisão do número 4 pela absorbância do padrão de 4-hidroxirolina. O cálculo da concentração de 4-hidroxirolina foi expresso em μg de 4-hidroxirolina por mg de tecido cutâneo seco.

$$F \times \text{Absorbância da amostra} \times \text{Volume do neutralizado} \times \text{Volume de HCL}$$

$$\text{Peso seco/ úmido da amostra}$$

Equação 1- Cálculo da concentração de 4-hidroxirolina

4.16. Extração de RNAm de tecido cutâneo

Após a coleta, a pele dos animais foi imediatamente imersa em nitrogênio líquido, em tubos de criopreservação. Em seguida, as amostras foram armazenadas em um freezer a -70°C até os procedimentos de análise. O RNA total foi extraído pelo método de Chomezynski e Sacchi, utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Cerca de 60 mg de tecido cutâneo foi separado e pesado em balança analítica. Esse tecido, congelado em nitrogênio líquido, foi submetido a um processo de pulverização por impacto, adquirindo aspecto de um pó fino. O material pulverizado foi transferido para um microtubo plástico, sendo acrescentado 1ml de Trizol, para homogeneização em agitador de tubos (Vortex). Para a separação do RNA, foram adicionados 200 μl de clorofórmio e as amostras foram novamente homogeneizadas por agitação em Vortex e mantidas à temperatura ambiente, por 10 minutos. Logo após, as amostras foram centrifugadas 12.000 rcf, por 15 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi transferido para outro microtubo. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 500 μl de isopropanol gelado. Após homogeneização por inversão, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente, por 5 minutos, e centrifugadas a 12.000 rcf por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA lavado com 1ml de etanol 80% e submetido a nova centrifugação por 10 minutos/12.000 rcf a 4°C . Esse processo foi repetido por 2 vezes. Então, o sobrenadante foi descartado e os precipitados de RNA foram secos, por inversão, em um fluxo laminar.

As amostras de RNA foram ressuspensas em 30 μl de H_2O deionizada livre de RNase, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC; Merck, Alemanha). Todas as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen, Life Technologies), para evitar contaminação com qualquer tipo de DNA remanescente, e guardadas em freezer -20°C até o dia seguinte para melhor dissolução das moléculas de RNA. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C .

4.17. Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras

A avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA mensageiro foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda no espectro ultravioleta (NanoVue Plus Spectrophotometer, GE Healthcare, UK), a partir de 2µl da amostra de RNA dissolvida em H₂O DEPC (Merck, Alemanha). O valor de concentração de RNA (ng/µl) dado pelo equipamento foi anotado para possibilitar o cálculo do volume de cada amostra, necessário para a transcrição reversa em cDNA. As amostras que apresentaram relações da absorbância de 260 nm e 280 nm (260/280) entre 1,7 e 2,0 foram consideradas de boa qualidade e utilizadas nos experimentos subsequentes.

4.18. Transcrição Reversa

O RNA total de cada amostra foi submetido à transcrição reversa para a síntese de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar).

A partir de 1µg de RNA total, as amostras foram reversamente transcritas em cDNA, em termociclador, utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA), otimizado para a síntese de cDNA de primeira fita, a partir de RNA total.

Tabela 2 -Tabela de volumes dos reagentes para reação de transcrição reversa

Componente	Volume por Reação
10X RT BUFFER	2 µl
25xdNTP	0,8 µl
10X RT RANDOM PRIMERS	2 µl
MULTISCRIBE RT	1 µl
NUCLEASE FREE H2O	4,2 µl
VOL RNA	X µl com 1µg
NUCLEASE FREE H2O	X µl para completar o volume final
VOLUME FINAL	20µl

4.19. Análise da Expressão Gênica por RT-qPCR

Para a reação em cadeia da polimerase em tempo real por transcriptase reversa RT-qPCR, foram selecionados os seguintes genes de interesse: *Col1a1* (cadeia $\alpha 1$ do colágeno I), *Col3a1* (cadeia $\alpha 1$ do colágeno III), *Col5a1* (cadeia $\alpha 1$ do colágeno V), *Col5a2* (cadeia $\alpha 2$ do colágeno V). As sequências dos genes foram adquiridas no site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide (Tabela 2). As expressões dos genes foram avaliadas por RT-qPCR, executadas em placas de 96 poços, utilizando-se o *StepOnePlus* (Applied Biosystems – Foster City, CA – USA) e o kit *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Life Technologies, USA).

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra) e amostra calibradora (junção de 1 μ L de todas as amostras). A expressão diferencial dos transcritos alvos foi determinada através do método de quantificação relativa, em relação a um controle endógeno ou gene normatizador. Para esse fim, foram testados o *Gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), o *B2m* (beta-2 microglobulina) e o *Hprt1* (hipoxantina-guanina fosforiboxiltransferase), sendo o B2m selecionado para as análises de expressão gênica por ser o mais expresso nas amostras avaliadas. As reações de RT-qPCR foram padronizadas para encontrar a melhor temperatura de anelamento para cada gene em estudo, permitindo a identificação de um único pico de fluorescência para cada gene das amostras analisadas.

Tabela 3 - Relação das sequências de oligonucleotídeos estudados

Gene	Sense 3' – 5'	Antisense 5' – 3'
<i>Gapdh</i>	ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG
<i>B2m</i>	CAT GGC TCG CTC GGT GAC C	AAT GTG AGG CGG GTG GAA CTG
<i>Hprt1</i>	AGC TAC TGT AAT GAT CAG TCA ACG	AGA GGT CCT TTT CAC CAG CA
<i>Col1a1</i>	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CG	GCT TCT TTT CCT TGG GGT TC
<i>Col3a1</i>	GCA CAG CAG TCC AAC GTA GA	TCT CCA AAT GGG ATC TCT GG

<i>Col5a1</i>	GGT CCC TGA CAC ACC TCA GT	TGC TCC TCA GGA ACC TCT GT
<i>Col5a2</i>	CCT CAG GGA ATT GAT GGA GA	AGA GCC AGG CAT GAG TCC TA

A expressão diferencial dos genes de interesse foi determinada utilizando o método de cálculo do Delta Ct (ΔCt), que corresponde ao número de Ct (Cycle Threshold) do gene de interesse normalizado pelo Ct do gene de controle endógeno B2m, através da fórmula matemática: $\Delta Ct = Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ gene referência}$. O valor de Ct corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente da reação cruze o limiar (threshold) acima do ruído de fundo (background), ou seja, a expressão do gene só é detectada quando o sinal fluorescente acumulado ultrapassa o threshold. Seguindo esse raciocínio, quanto menor o Ct, menor o número de ciclos de PCR necessários para detectar um gene, portanto maior sua expressão. Os valores de Ct para as amostras foram obtidos pela análise dos resultados dados pelo *StepOne Software v2.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A expressão relativa, usada para as análises estatísticas foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ da amostra} - \Delta Ct \text{ médio das amostras do grupo controle}$$

Equação 2- Cálculo $\Delta\Delta Ct$

4.20. Pesquisa de anticorpos anti-células HEp-2 (FAN)

A análise de Fator antinuclear (FAN) nos soros do modelo IMU-COLV e CT nos períodos de 15, 30, 45 e 120 dias foi realizada em lâminas com células HEp-2 (células de carcinoma de laringe humano) (Kit Nova-Lite HEp-2 ANA, Inova, EUA), para a pesquisa de autoanticorpos. Os soros foram diluídos na proporção de 1:80 em tampão PBS/Tween20 e incubados nas lâminas com células HEp-2, por 30 minutos (68). Após um ciclo de lavagem, de 3 vezes de 10 minutos com PBS/Tween20, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário ALEXA FLUOR 488 anti-IgG de camundongo (INVITROGEN, EUA), diluído 1:200 em PBS/Tween20. Posteriormente, após outro ciclo de lavagem com PBS/Tween20, as lâminas foram secas, a fim de

retirar o excesso de solução, e montadas em lamínulas com glicerina tamponada, para a visualização em microscópio de fluorescência (Olympus BX51). A leitura foi feita conforme o Consenso Internacional sobre padrões ANA (ICAP) (97).

4.21. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados mediante testes estatísticos para comparação, baseado nos tipos de distribuição das variáveis. As distribuições foram consideradas paramétricas ou não paramétricas, segundo sua distribuição utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Os valores obtidos pelos estudos de cada variável contínua foram organizados e descritos pela média e desvio padrão (DP). Para a comparação entre as médias dos grupos amostrais foi utilizado o ANOVA de uma via e Tukey ou Sidak como pós-teste, para variáveis de distribuição normal, e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, para variáveis de distribuição não-normal. Para ser considerada diferença entre médias e frequências ou a presença de correlação entre variáveis, foi utilizado o valor de significância estatística menor a 5 % ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Para avaliar o desenvolvimento do remodelamento cutâneo ao longo de 15, 30, 45 e 120 dias, após a primeira imunização com Col V em camundongos C57BL/6, foram analisados: os aspectos morfológicos e histopatológicos, assim como a espessura da pele, a expressão de VEGF, caspase-3, α -AML, vimentina, colágeno dos tipos I, III e V, expressão dos genes *Col1a1*, *Col3a1*, *Col5a1* e *Col5a2* no tecido e pesquisa de fator antinuclear no soro. Ainda, para avaliar a sinalização célula-matriz, foram avaliados: a síntese dos colágenos fibrilares I, III e V e α -AML nos fibroblastos cutâneos do modelo experimental IMU-COLV e em fibroblastos cutâneos de animais controles estimulados com Col V.

5.1 Perfil morfológico da pele durante o desenvolvimento do modelo de ES

Na **Figura 5 A**, evidencia-se no grupo IMU-COLV-15 dias a camada córnea preservada (**Figura 5 A**), nos grupos IMU-COLV 30 (**Figura 5 B**) e IMU-COLV 45 dias (**Figura 5 C**) observamos uma discreta alteração, tornando-se mais evidente no grupo IMU-COLV-120 dias (**Figura 5 D**). Esta evolução caracteriza-se por projeções das papilas dérmicas em direção à derme papilar nos grupos imunizados, quando comparados aos grupos CT (**Figura 5 E-H**). Quanto às alterações na distribuição das fibras de colágeno nos grupos IMU-COLV 15 e 30 dias (**Figura 5 A-B**), destaca-se um padrão morfológico homogêneo, com as fibras dispostas paralelamente à epiderme, e uma tênue diminuição da camada de adipócitos da região da derme reticular e profunda, em comparação aos grupos CT (**Figura 5 E-F**). No grupo IMU-COLV 45 dias (**Figura 5 C**), as fibras de colágeno da derme papilar evoluem para um padrão heterogêneo, com importante desorganização e formação de agregados. Também há evidente diminuição do tecido adiposo e atrofia de anexos cutâneos, com espessamento da parede de vasos sanguíneos na derme reticular e profunda da pele. Por outro lado, no grupo IMU-COLV 120 dias (**Figura 5 D**),

destaca-se a desorganização fibrilar e formação de agregados, o que não é observado nos grupos CT (**Figura 5 E-H**).

Essas alterações, evidenciadas pela coloração de hematoxilina/eosina, mimetizam o padrão histológico encontrado na pele de pacientes com ES e foram confirmadas pela análise quantitativa da espessura da pele, que mostrou diferença significativa entre os grupos IMU-COLV 15 dias e IMU-COLV 45 dias ($203,40 \pm 39,43$ vs $252,70 \pm 29,16$, $p=0,0017$) (dados expressos em média \pm DP) (**Figura 5 I**).

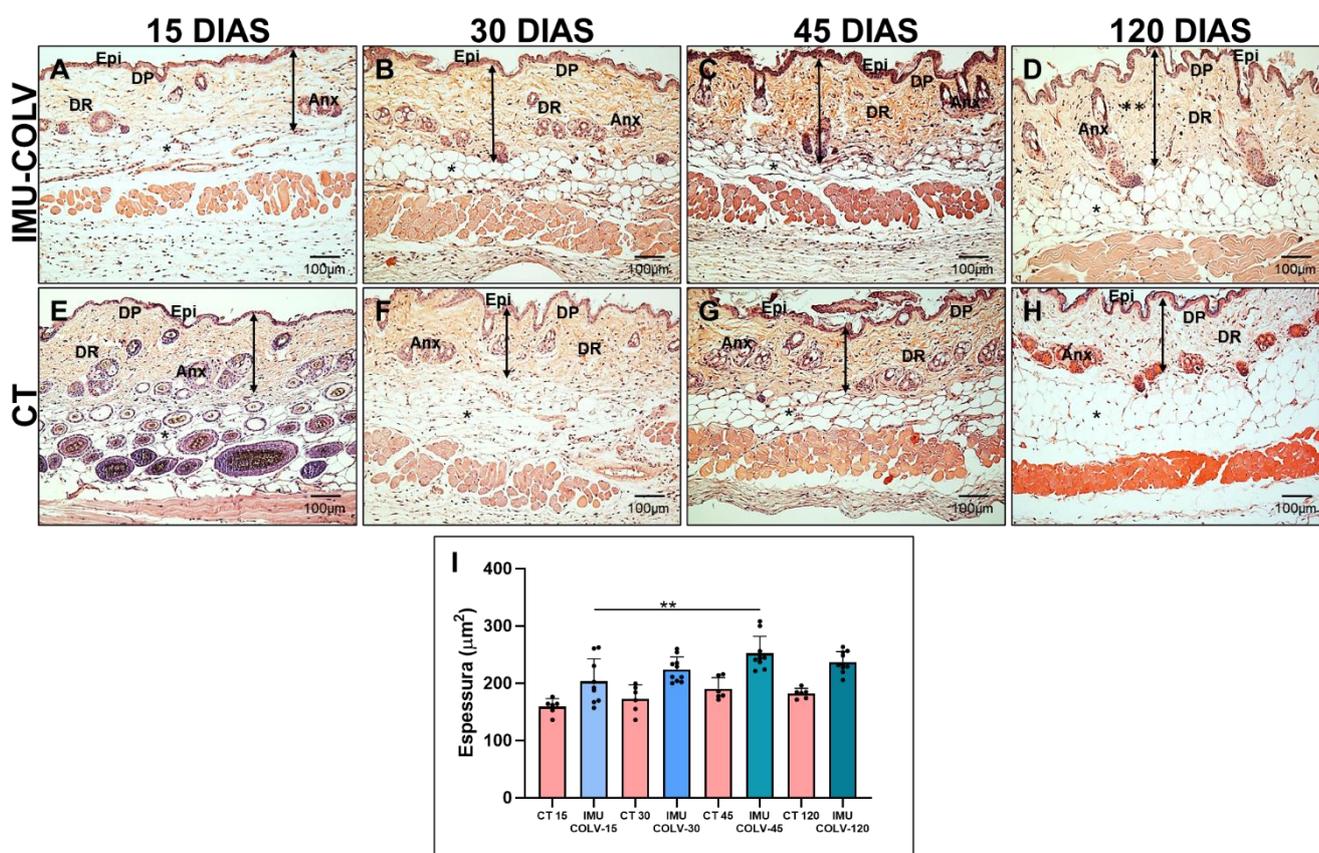


Figura 5 - Micrografias representativas dos aspectos morfológicos da pele dos grupos de camundongos IMU-COLV e CT coradas com Hematoxilina/Eosina. Na epiderme (Epi) do grupo IMU-COLV 15 dias, a camada córnea preservada (**A**), presença de projeções das papilas dérmicas em direção à derme papilar no grupo IMU-COLV 30 dias (**B**), que se intensifica no grupo IMU-COLV 45 (**C**) e 120 (**D**) dias, quando comparados com os grupos CT (**E-H**). Notar nos grupos IMU-COLV 15 dias (**A**) e IMU-COLV 30 dias (**B**), a derme papilar (DP) apresentando um padrão homogêneo, com fibras de colágeno dispostas paralelamente à epiderme (Epi) e tênue diminuição da camada de adipócitos da região profunda da pele, quando comparados ao grupo CT (**E-H**). No grupo IMU-COLV 45 dias (**C**), a derme papilar (DP) evolui para um padrão heterogêneo, importante desorganização e formação de agregados das fibras de colágeno, diminuição do tecido adiposo na região profunda da pele (*) e tendência de diminuição dos anexos cutâneos (Anx). Notar no grupo IMU-COLV 120 dias (**D**) a desorganização das fibras de

colágeno (**), quando comparamos ao grupo CT (E-H). Setas duplas: espessura da pele, medida abaixo do epitélio até o início da camada adiposa. Em **(I)** - representação gráfica dos valores da espessura da derme nos grupos IMU-COLV e CT. Observamos diferença significativa entre os grupos IMU-COLV 15 e 45 dias (** $p=0,0017$). *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelo pós-teste de Sidak* (aumento de 200X).

Quando avaliado a distribuição e morfologia das fibras de colágeno pelo Tricrômico de Masson, confirma-se o padrão morfológico encontrado no H&E. No grupo IMU-COLV 15 dias (**Figura 6 A**), as fibras de colágeno estão orientadas longitudinalmente à camada epitelial, obedecendo a um padrão normal de distribuição no tecido cutâneo, assim como no seu respectivo controle (**Figura 6 E**). Por outro lado, no grupo IMU-COLV 30 dias, observa-se irregularidades do colágeno na derme papilar, principalmente no que diz respeito à desorganização das fibras, resultando em um padrão histológico heterogêneo, lembrando um início de remodelamento cutâneo (**Figura 6 B**). Nos animais do grupo IMU-COLV 45 dias (**Figura 6 C**), o processo se intensifica, no que se refere à desorganização e dissociação das fibras de colágeno, que obedecem a um padrão circular, com a formação de lacunas entre o conglomerado de fibras e uma invasão da camada de adipócitos na derme profunda. No grupo IMU-COLV 120 dias (**Figura 6 D**), a desorganização fibrilar aumenta, evidenciada por uma textura espessa e fragmentada na derme papilar e reticular, assim como nos anexos cutâneos.

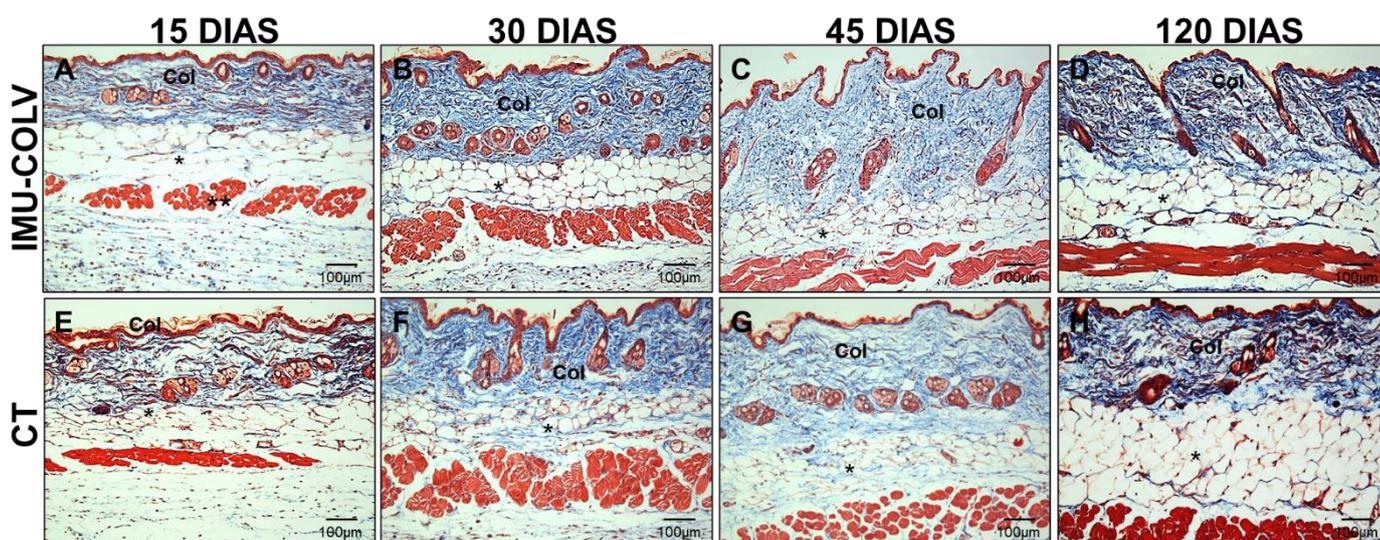


Figura 6 - Imagens representativas do perfil morfológico do colágeno cutâneo nos grupos de camundongos IMU-COLV e CT coradas pelo Tricrômico de Masson. No grupo IMU-COLV 15 dias **(A)**, identificamos a distribuição das fibras de colágeno (Col) (azul) orientadas longitudinalmente à camada epitelial, envolvendo vasos e anexos cutâneos, com tecido adiposo (*) e camada muscular obedecendo um padrão normal, similar ao respectivo controle **(E)**. Em **(B)**, no grupo IMU-COLV 30 dias, observa-se irregularidades do colágeno na derme papilar com alteração na disposição das fibras de colágeno e início de remodelamento, quando comparado ao controle **(F)**. Nos animais IMU-COLV 45 dias **(C)**, observa-se intensa desorganização e dissociação das fibras de colágeno, adquirindo um padrão circular, formação de lacunas entre o conglomerado de fibras, invadindo a camada de adipócitos da derme profunda (*), ausente no respectivo controle **(G)**. No grupo IMU-COLV 120 dias **(D)**, identificamos o processo de intenso de desorganização fibrilar e a presença de fibras mais espessas de colágeno ocupando a derme papilar e reticular, assim como envolvendo anexos cutâneos. **(Aumento 200X)**

5.2 Avaliação bioquímica da pele

Na dosagem bioquímica da 4-Hidroxirolina, observou-se um aumento significativo do conteúdo total de colágeno no grupo IMU-COLV 45 dias em relação ao controle ($8,90 \pm 1,61$ vs $5,57 \pm 1,57$, $p=0,0243$). **(Figura 7)**.

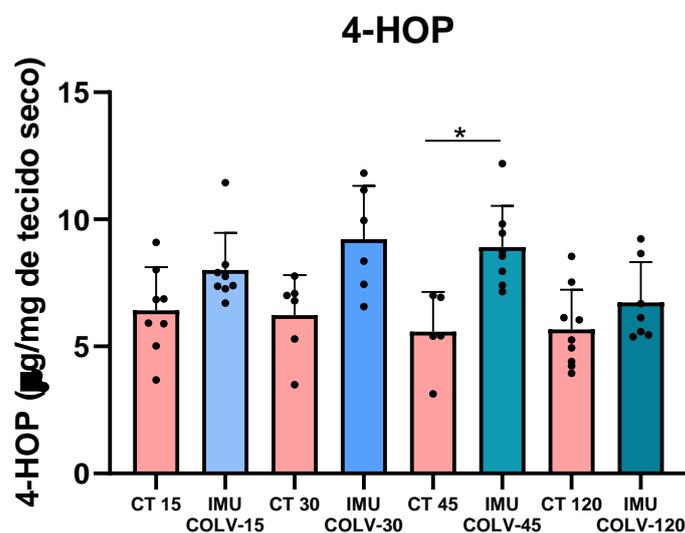


Figura 7 - Concentração de colágeno total na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV e CT. Representação gráfica do conteúdo de 4-hidroxirolina, identificando a diferença estatística entre os grupos de 45 dias e controle ($*p=0,0177$). *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelos pós- teste de Sidak.*

5.3 Análise estrutural da matriz fibrilar da pele durante o desenvolvimento do modelo de ES

Para análise da proporção do colágeno no tecido cutâneo, utilizamos a imunomarcagem para o colágeno dos tipos I, III e V por imunofluorescência. A composição e distribuição dessas proteínas foi analisada pela quantificação da proporção de volume dos tipos de fibras no tecido cutâneo, em diferentes fases do desenvolvimento do modelo experimental.

Na **Figura 8**, observa-se a imunomarcagem para o colágeno do tipo I (COL I), que mostra nos grupos IMU-COLV 15 e 30 dias a distribuição dessa proteína preenchendo toda derme, obedecendo um padrão normal, orientando-se longitudinalmente ao epitélio, similar ao controle normal. Ainda, o colágeno I se dispõe ao redor de anexos cutâneos e na parede de pequenos vasos (**Figura 8 C-D**). Interessante, no grupo IMU-COLV 30 dias, há presença de espessamento perto da membrana basal do epitélio e anexos cutâneos (**Figura 8 D**). Esse processo intensifica-se no grupo IMU-COLV 45 dias, agora com ausência de espessamento próximo a membrana basal, dando lugar a agregados de fibras caracterizadas pela intensa fluorescência, com aparência nodular nesse grupo, quando comparamos com o controle (**Figura 8 E**). Esse processo intensifica-se no grupo IMU-COLV 120 dias ocupando toda derme, tanto a reticular como a papilar (**Figura 8 F**). Esse resultado mostra que as alterações fibrilares na pele observadas no H&E (**Figura 5 A-H**) e no Tricrômico de Masson (**Figura 6 A-H**), têm grande participação do colágeno tipo I. A avaliação quantitativa comprova esse achado (**Figura 8 G**), demonstrando aumento significativo dessa proteína entre os grupos IMU-COLV 15 e 120 dias ($13,62 \pm 1,87$ vs $17,34 \pm 2,04$, $p=0,0004$) e IMU-COLV 30 e 120 dias ($12,82 \pm 1,46$ vs $17,34 \pm 2,04$, $p<0,0001$); média \pm DP. Como não observamos diferenças morfológicas entre o grupo controle sem adjuvante (CT normal) e CT com adjuvante, excluímos o grupo CT sem adjuvante das análises quantitativas.

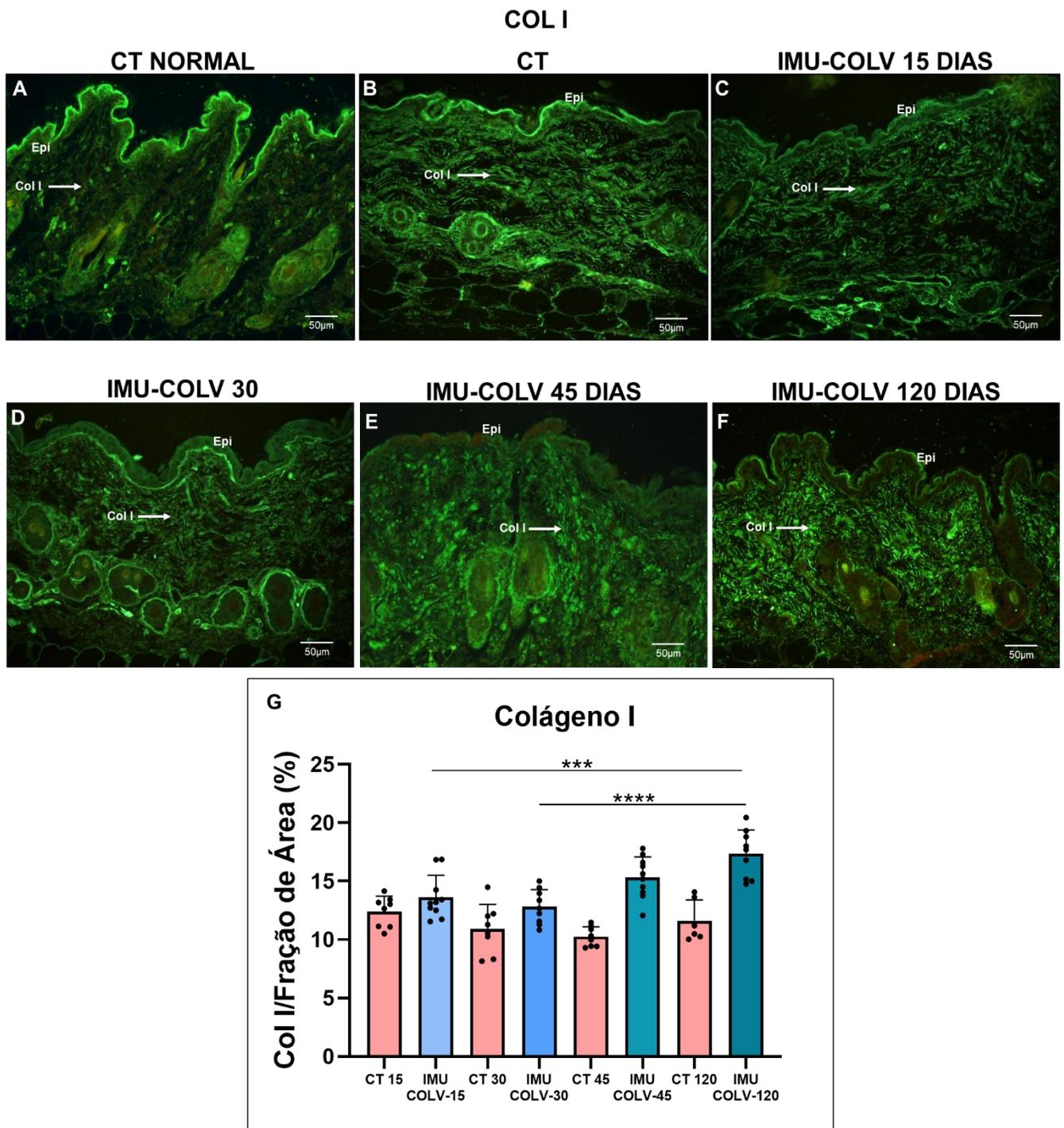


Figura 8 - Expressão de colágeno tipo I na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV, CT normal e CT. O colágeno tipo I apresentou um padrão de fibras grossas ao longo da derme papilar e derme reticular (**setas**) na pele dos grupos IMU-COLV, CT e sadio (**A-F**). Esse padrão é mais evidente nos grupos de 45 e 120 dias (**E, F**). (**G**) Representação gráfica da quantificação da expressão de colágeno tipo I, identificando a diferença estatística entre o grupo IMU-COLV 120 dias com os grupos IMU-COLV 15 e 30 dias (15 vs 120 dias (***) $p=0,0004$); 30 vs 120 dias (***) $p<0,0001$). *GraphPad Prism* versão 8; Anova one way, seguido pelo pós- teste de Sidak.

Quanto à avaliação da distribuição do colágeno do tipo III (COL III), identificamos na **Figura 9 C-D**, a expressão das fibras dispostas na forma de fibras finas, também preenchendo toda derme nos grupos IMU-COLV 15 e 30 dias. Ainda, pode-se observar na derme papilar os mesmos agregados fibrilares presentes no grupo IMU-COLV 45 dias e espessamento da parede de pequenos vasos (**Figura 9 E**), quando comparados aos grupos IMU-COLV 15 e 30 dias e aos grupos CT e CT normal (**Figura 9 A-D**). No grupo IMU-COLV 120 dias, a expressão de colágeno III é mais intensa, e perde a orientação inicial das suas fibras, que se distribuem horizontalmente na derme papilar e reticular da pele (**Figura 9 F**). Novamente, esses dados foram justificados pela análise quantitativa (**Figura 9 I**), que mostrou aumento significativo da expressão de colágeno III no tecido cutâneo entre os grupos IMU-COLV 15 e 120 dias ($10,27 \pm 1,16$ vs $13,77 \pm 1,73$, $p=0,0085$), IMU-COLV 30 e 120 dias ($9,816 \pm 1,330$ vs $13,77 \pm 1,73$, $p=0,0008$); média \pm DP.

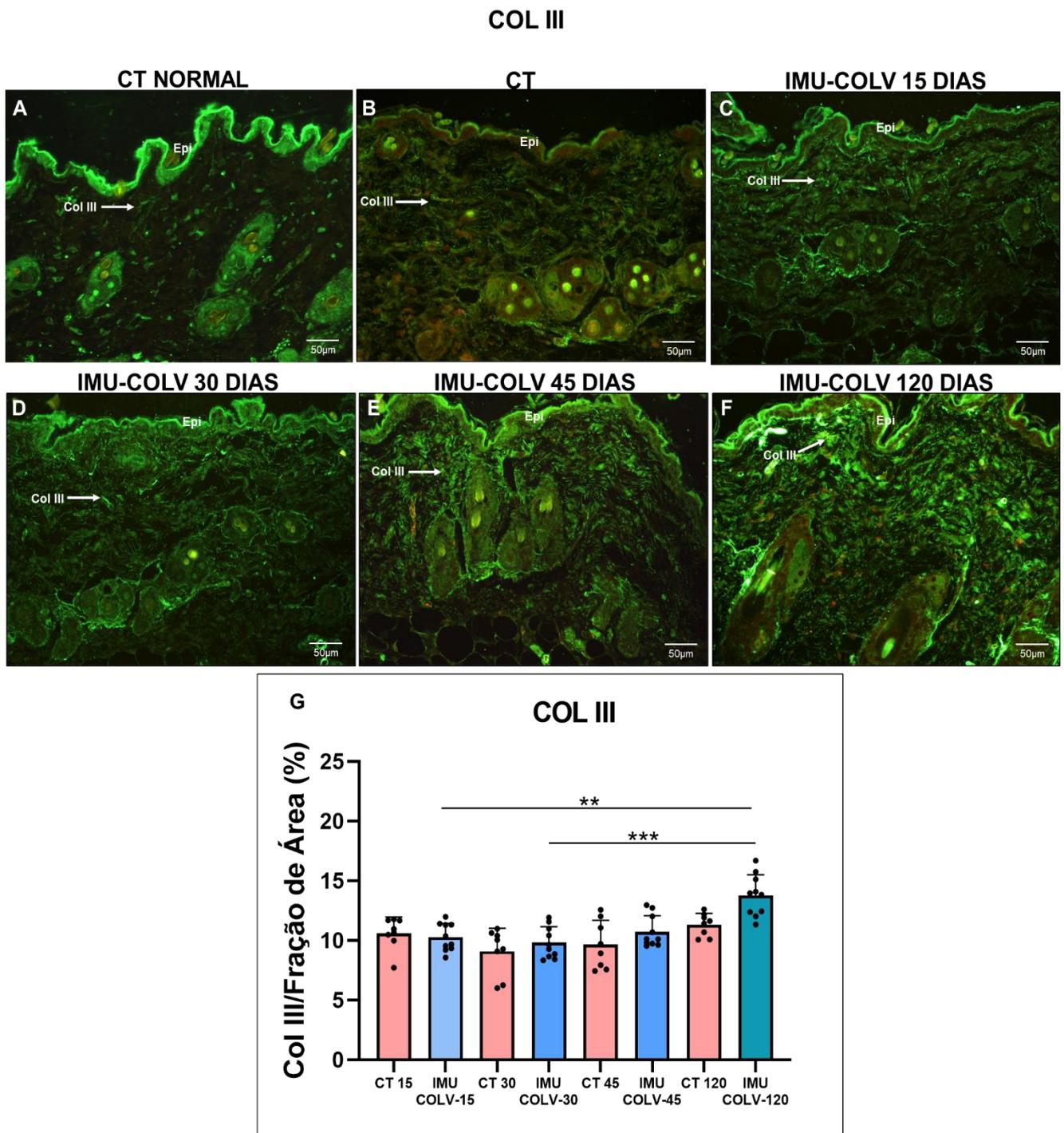


Figura 9 - Expressão de colágeno tipo III na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV, CT normal e CT. O colágeno tipo III apresentou um padrão fibrilar fino (**setas**) na pele dos grupos IMU-COLV, CT e sadio (**A-F**), sendo mais evidente no grupo de 120 dias (**F**). (**G**) Representação gráfica da quantificação da expressão de colágeno tipo III, mostrando a diferença estatística entre o grupo IMU-COLV 120 dias, em relação aos grupos de 15 e 30 dias; 15 vs 120 dias (** $p=0,0085$) e 30 vs 120 dias (** $p=0,0008$). *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's.*

Na distribuição das fibras de Col V, observamos no grupo IMU-COLV 15 dias, fibras finas e tênues distribuídas em toda derme, quando comparamos ao grupo controle (**Figura 10 A-C**). No entanto, a partir do grupo IMU-COLV 30 dias, essa proteína aparece mais evidente na derme papilar e reticular, envolvendo os anexos cutâneos (**Figura 10 D**). Por outro lado, nos grupos IMU-COLV 45 e 120 dias (**Figura 10 E-F**), o aumento é mais evidente, com algumas regiões apresentando intensos agregados e desorganização fibrilar, predominantemente perto de vasos e capilares. Esses dados são suportados pela análise quantitativa (**Figura 10 G**), que indicou aumento entre os grupos IMU-COLV 15 e 45 dias ($11,09 \pm 2,13$ vs $14,50 \pm 2,08$, $p=0,0025$), IMU-COLV 15 e 120 dias ($11,09 \pm 2,13$ vs $15,76 \pm 2,07$, $p<0,0001$), IMU-COLV 30 e 45 dias ($11,17 \pm 2,20$ vs $14,50 \pm 2,08$, $p=0,0035$) e IMU-COLV 30 e 120 dias ($11,17 \pm 2,20$ vs $15,76 \pm 2,07$, $p<0,0001$); média \pm DP.

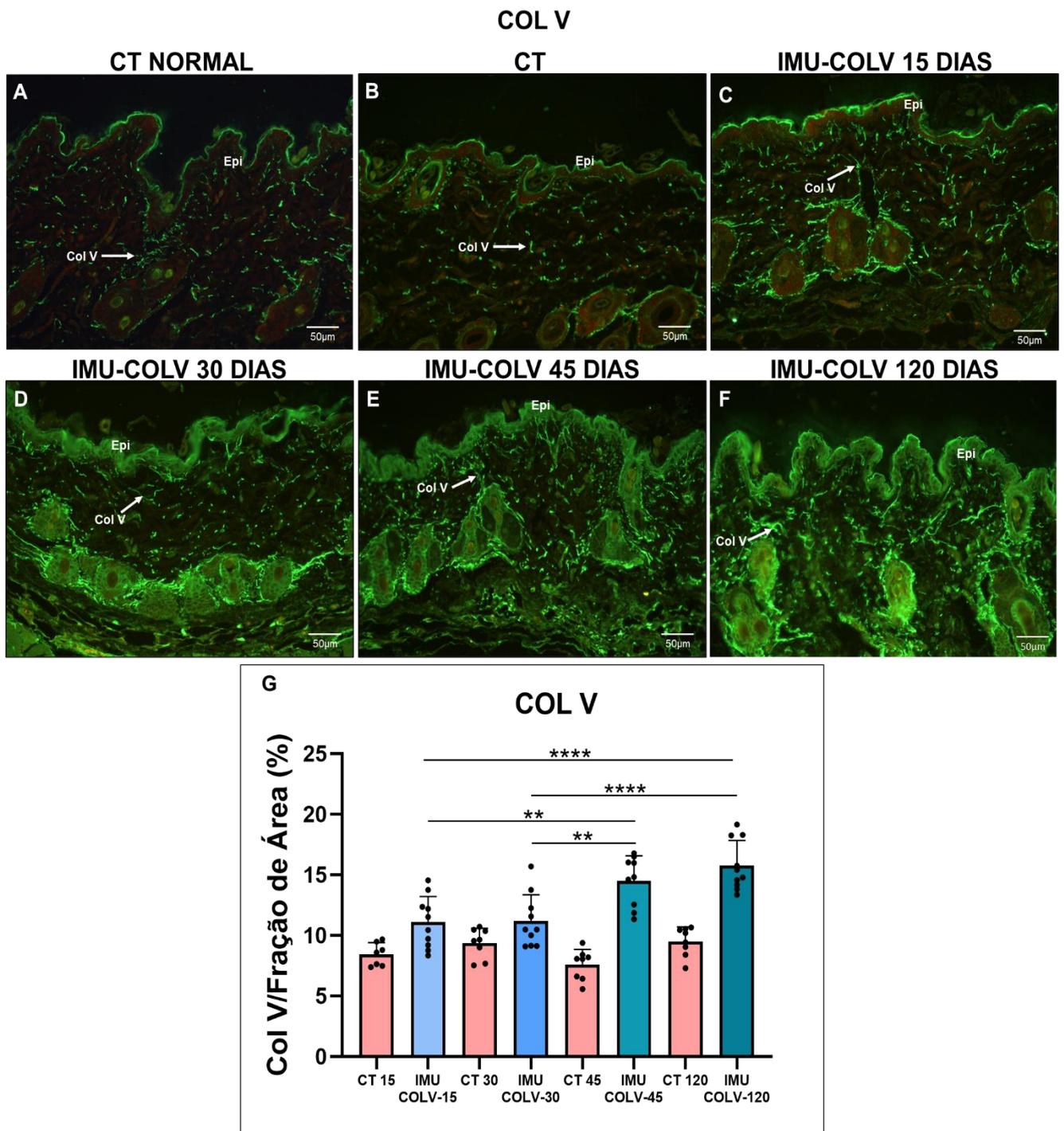


Figura 10 - Expressão de colágeno tipo V na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV, CT normal e CT. O colágeno tipo V apresenta um padrão fibrilar fino evidente na derme papilar e reticular (**setas**) e ao redor dos anexos na pele dos grupos IMU-COLV (**C-F**), sendo mais intensificado no grupo de 45 e 120 dias (**E-F**). (**G**) Representação gráfica da quantificação da expressão de colágeno tipo V, identificando a diferença estatística entre os grupos IMU-COLV 45 e 120 dias com os grupos IMU-COLV 15 e 30 dias (15 vs 45 dias; ** $p=0,0025$); (15 vs 120 dias; **** $p<0,0001$); (30 vs 45 dias; ** $p=0,0035$); (30 vs 120 dias; **** $p<0,0001$). *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelo pós- teste de Sidak.*

5.4 Expressão dos genes *Col1a1*, *Col3a1*, *Col5a1* e *Col5a2* na pele

O RNAm total extraído da pele dos grupos IMU-COLV e controle foi utilizado para avaliar a expressão de RNAm para as cadeias $\alpha 1$ do colágeno dos tipos I e III e das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do Col V por meio de RT-PCR em tempo real.

A avaliação da expressão dos genes para os principais tipos de colágeno, encontrados na pele, demonstrou que a expressão relativa, para o gene que codifica a cadeia $\alpha 1$ do colágeno I (*Col1a1*) e o gene que codifica a cadeia $\alpha 1$ do colágeno III (*Col3a1*), não mostrou diferença significativa entre os grupos (**Figura 11 A-B**). Por outro lado, observamos diferença significativa na expressão relativa para o gene que codifica a cadeia $\alpha 1$ do Col V (*Col5a1*) no grupo IMU-COLV 15 dias ($1,79 \pm 0,74$ vs $0,82 \pm 0,14$, $p=0,0182$) (**Figura 11 C**) e na expressão do gene da cadeia $\alpha 2$ do Col V (*Col5a2*) ($2,64 \pm 0,61$ vs $1,01 \pm 0,15$, $p=0,0243$), quando comparados ao controle (**Figura 11 D**).

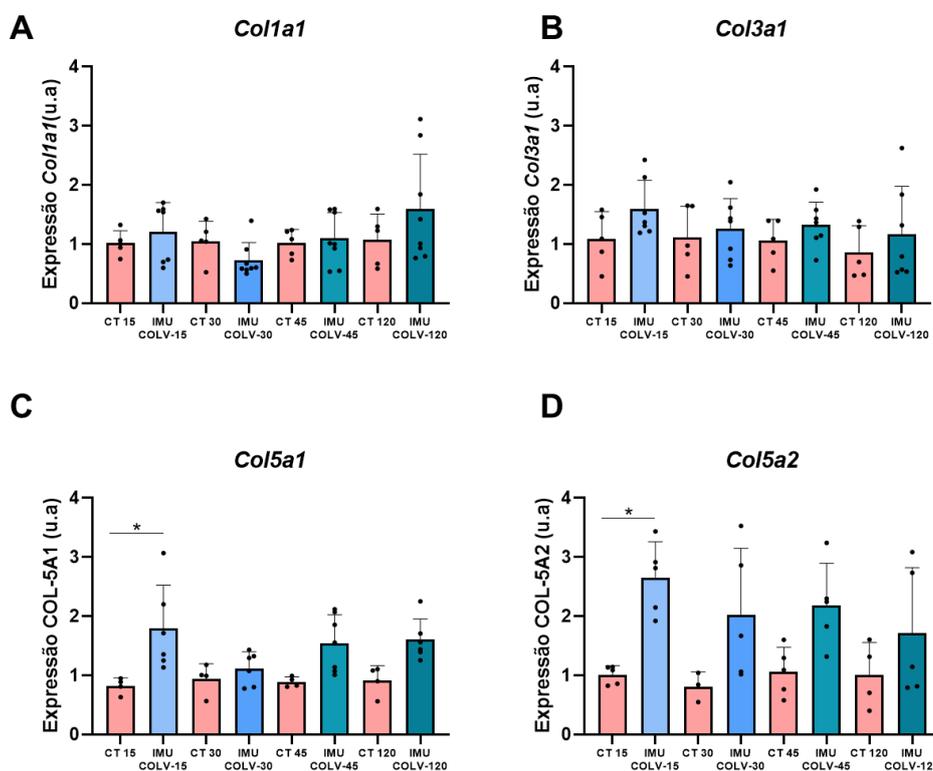


Figura 11 - Expressão relativa dos genes *Col1a1*, *Col3a1*, *Col5a1* e *Col5a2* em amostras de pele de camundongos dos grupos IMU-COLV e CT. **(A-D)**. **(C)** Representação gráfica da expressão relativa do gene *Col5a1*, identificando a diferença estatística entre os grupos de 15 dias e controle (* $p=0,0182$). **(D)** Representação gráfica da expressão relativa do gene *Col5a2*, identificando a diferença estatística entre os grupos de 15 dias e controle (* $p=0,0243$). *GraphPad Prism* versão 8; Anova one way, seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.5 Análise de fibroblastos e miofibroblastos na pele durante o desenvolvimento do modelo de ES

Adicionalmente, para avaliar a relação entre o aumento na produção dos diferentes tipos de colágeno e duas das principais células que sintetizam essa proteína, os fibroblastos e os miofibroblastos, avaliou-se a expressão de vimentina e α -AML no tecido cutâneo dos grupos estudados.

Avaliou-se a positividade para vimentina na derme papilar e reticular, bem como na parede do vaso em todos os grupos, IMU-COLV-15, 30, 45 e 120 dias, porém a análise quantitativa não mostrou diferença significativa entre os grupos (**Figura 12 A-G**)

Nossos resultados mostram baixa frequência de positividade para α -AML, nas células da derme e nas paredes dos vasos nos grupos IMU-COLV 15, 30 e 45 dias (**Figura 13 A-E**). Em contraste, observamos intensa imunomarcacão para α -AML, no grupo IMU-COLV 120 dias, tanto na derme papilar e reticular, como na parede dos vasos (**Figura 13 F**). Ainda, a análise quantitativa dessas células, confirma essas observações, indicando aumento significativo de miofibroblastos, positivos para α -AML+ no grupo IMU-COLV 120 dias em relação ao grupo IMU-COLV 15 dias ($34,64 \pm 6,90$ vs $53,08 \pm 12,82$, $p=0,0154$) (**Figura 13 G**).

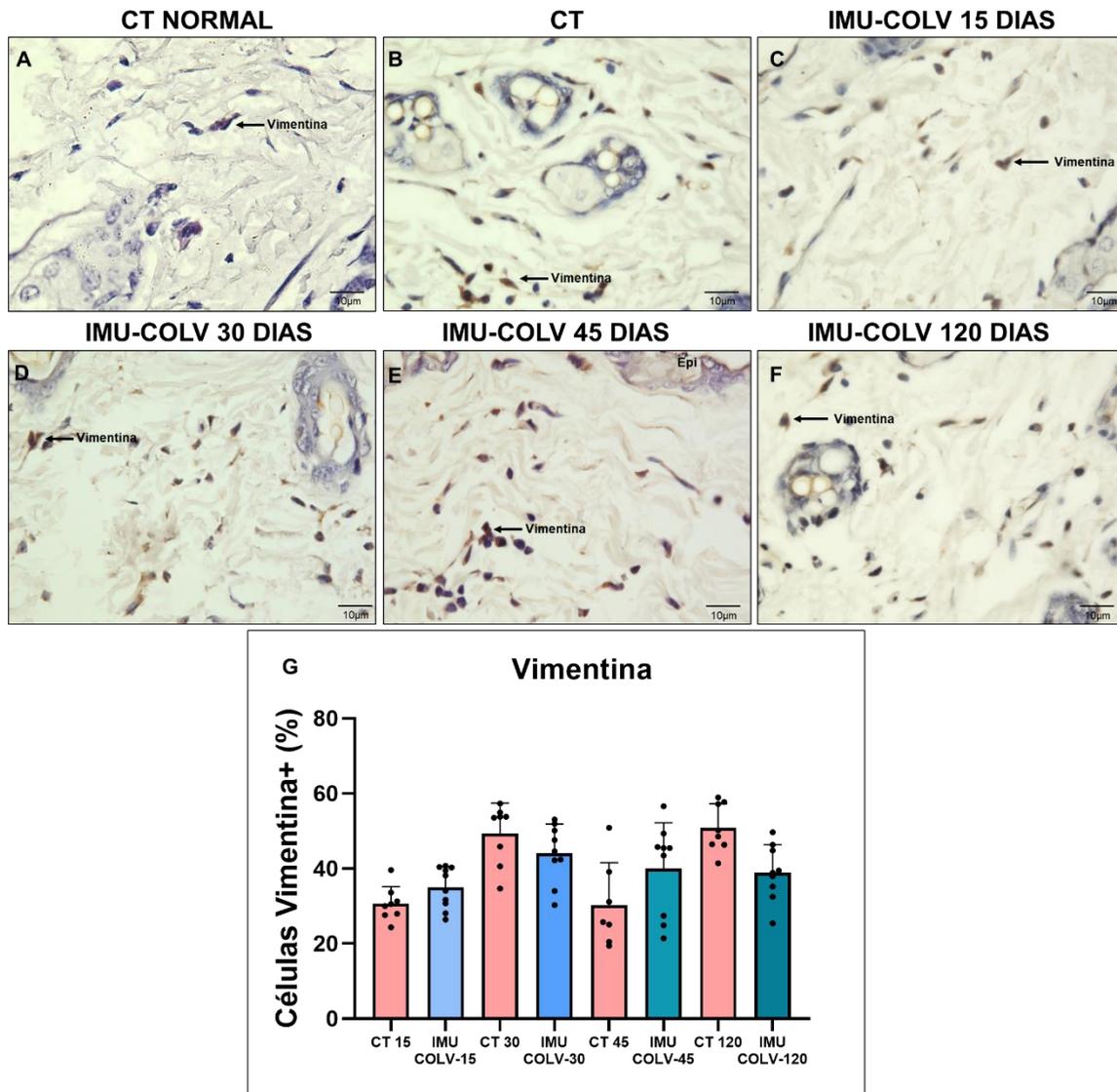


Figura 12- Expressão de vimentina em fibroblastos da pele de camundongos dos grupos IMU-COLV, CT normal e CT. As células vimentina-positivas são coradas em marrom (**setas**) (A-F). (G) Representação gráfica da quantificação da expressão de vimentina, mostrando que não houve diferença estatística entre os grupos. *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelo pós- teste de Sidak.*

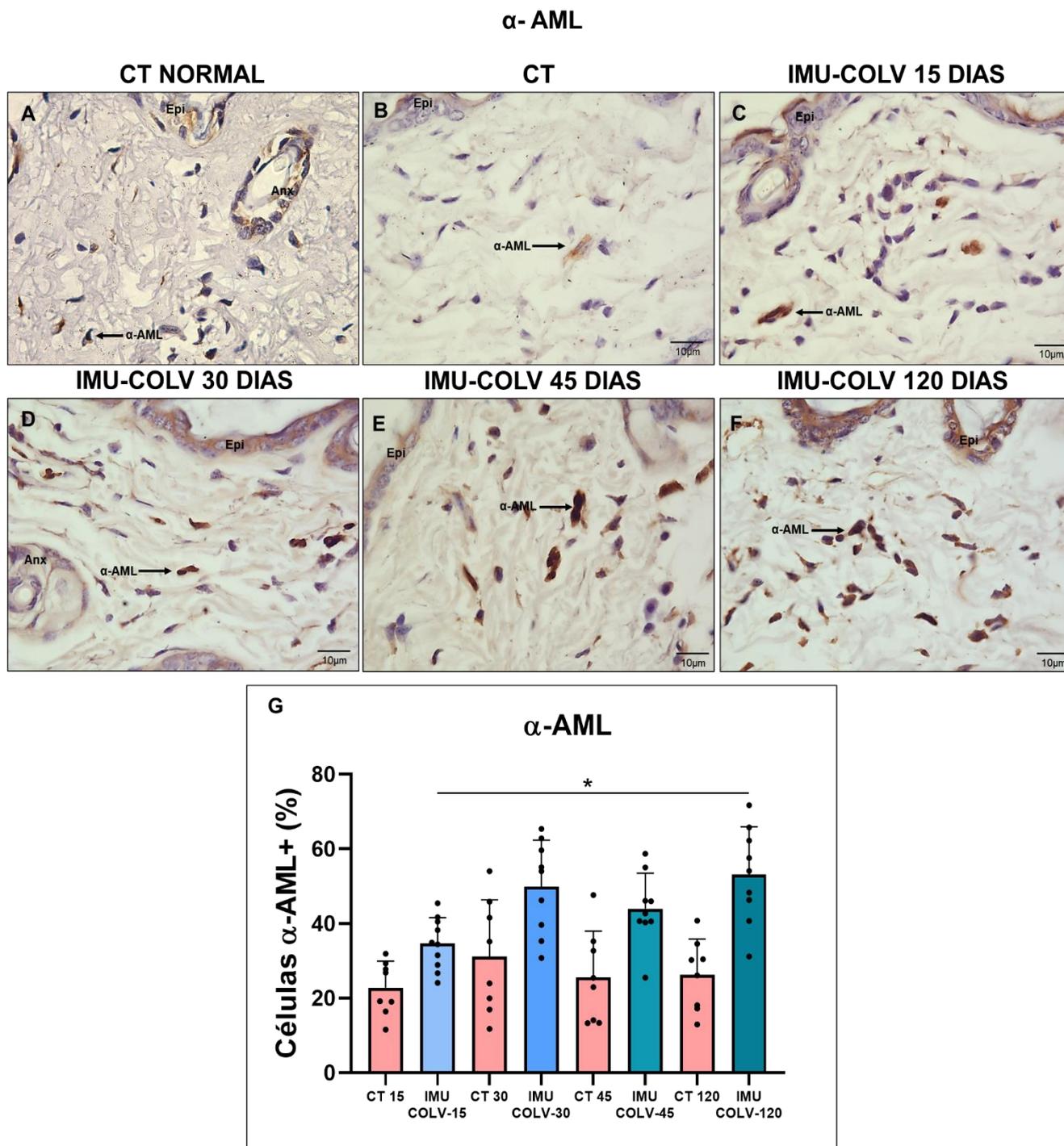


Figura 13 - Expressão de alfa actina do músculo liso (α -AML) em miofibroblastos da pele de camundongos dos grupos IMU-COLV, CT normal e CT. As células α -AML-positivas são coradas em marrom (**setas**) (**A-F**). Observamos um aumento da expressão de α -AML na derme do grupo de 120 dias (**F**), quando comparado aos grupos de 15 dias (**C**), CT e sadio (**A-B**). (**G**) Representação gráfica da quantificação da expressão de α -AML, identificando a diferença estatística entre os grupos de 15 e 120 dias (* $p=0,0154$). *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelo pós- teste de Sidak.*

5.6 Análise da reatividade vascular e apoptose celular

No que se refere ao VEGF, foi identificado um aumento significativo da imunomarcagem nas células do endotélio dos pequenos vasos, em ambas as regiões da pele, papilar e reticular, entre os grupos IMU-COLV 45 e 120 dias (**Figura 14 E-F**), em relação ao grupo IMU-COLV 15 dias (**Figura 14 C**). A análise quantitativa (**Figura 14 G**), corrobora com nossos dados morfológicos, onde também observamos um aumento significativo da expressão de VEGF nos grupos 45 e 120 dias, quando comparados ao grupo IMU-COLV 15 dias; 15 vs 45 dias ($57,15 \pm 7,21$ vs $75,01 \pm 4,47$, $p=0,0353$) e 15 vs 120 dias ($57,15 \pm 7,21$ vs $80,02 \pm 7,164$, $p=0,0111$); média±DP.

Ainda, os dados referentes a imunomarcagem para Caspase-3, também indicam apoptose de células endoteliais, caracterizada pela positividade, principalmente nos pequenos vasos dos grupos IMU-COLV 45 e 120 dias (**Figura 15 E-F**), em relação aos grupos IMU-COLV 15 e 30 dias (**Figura 15 C-D**). Esses dados são justificados pela análise quantitativa (**Figura 15 G**) que indicou aumento entre os grupos IMU-COLV 15 e 45 dias ($54,84 \pm 7,050$ vs $70,19 \pm 5,66$, $p<0,0001$), IMU-COLV 15 e 120 dias ($54,84 \pm 7,050$ vs $74,72 \pm 4,770$, $p<0,0001$), IMU-COLV 30 e 45 dias ($59,57 \pm 3,669$ vs $70,19 \pm 5,66$, $p=0,0032$) e IMU-COLV 30 e 120 dias ($59,57 \pm 3,669 \pm 1,604$ vs $74,72 \pm 4,770$, $p<0,0001$); média±DP.

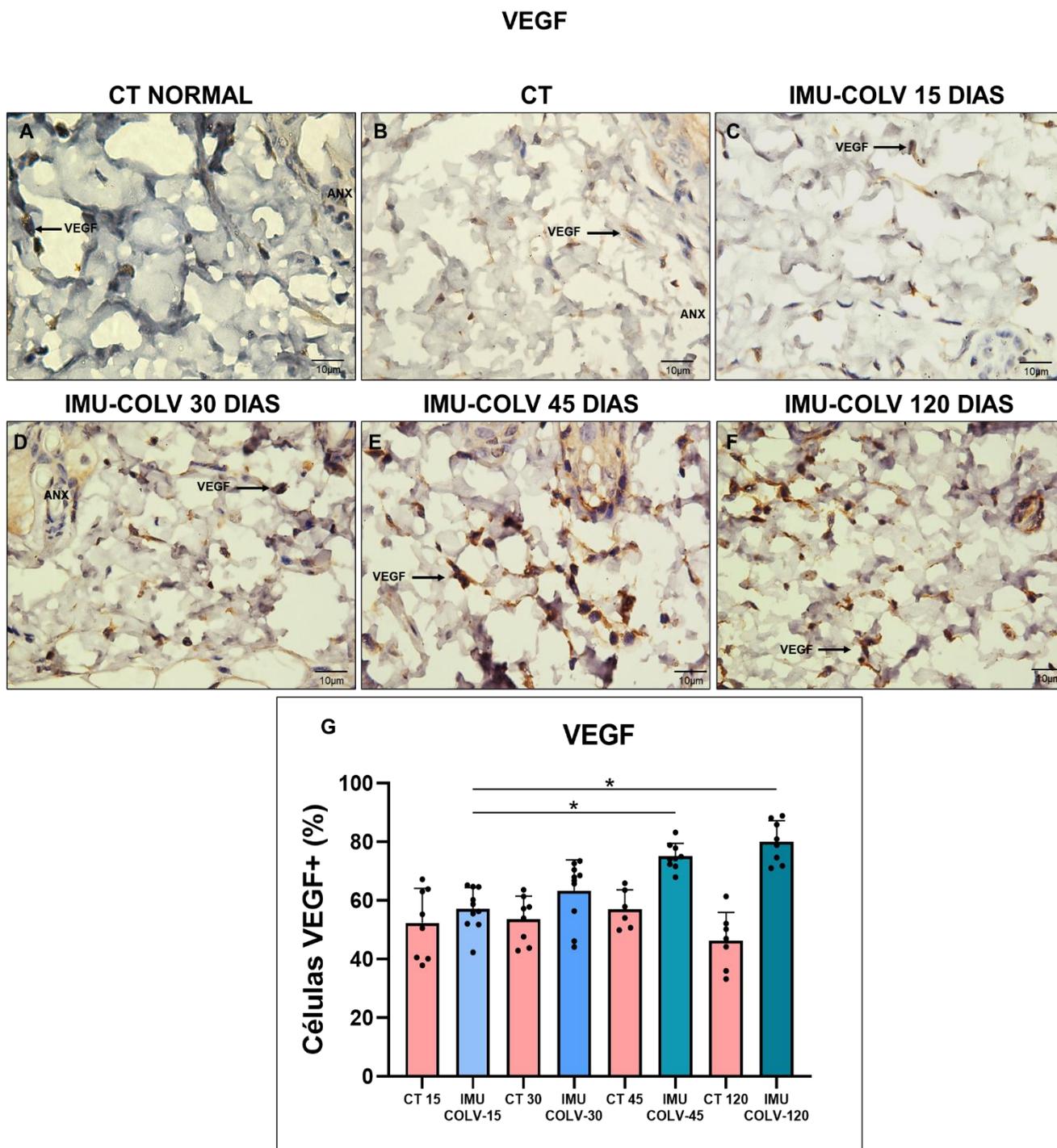


Figura 14 - Expressão de VEGF na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV, CT normal e CT. As células VEGF-positivas são coradas em marrom (**setas**) (A-F). Observamos um aumento da expressão de VEGF nos grupos 45 e 120 dias (E-F), quando comparados ao grupo de 15 dias (C). (G) Representação gráfica da quantificação da expressão de VEGF, identificando a diferença estatística entre os grupos IMU-COLV de 15 e 45 dias (* $p=0,0353$) e 15 e 120 dias (* $p=0,0111$). *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, Kruskal-Wallis, seguido pelo pós- teste de Dunn's.*

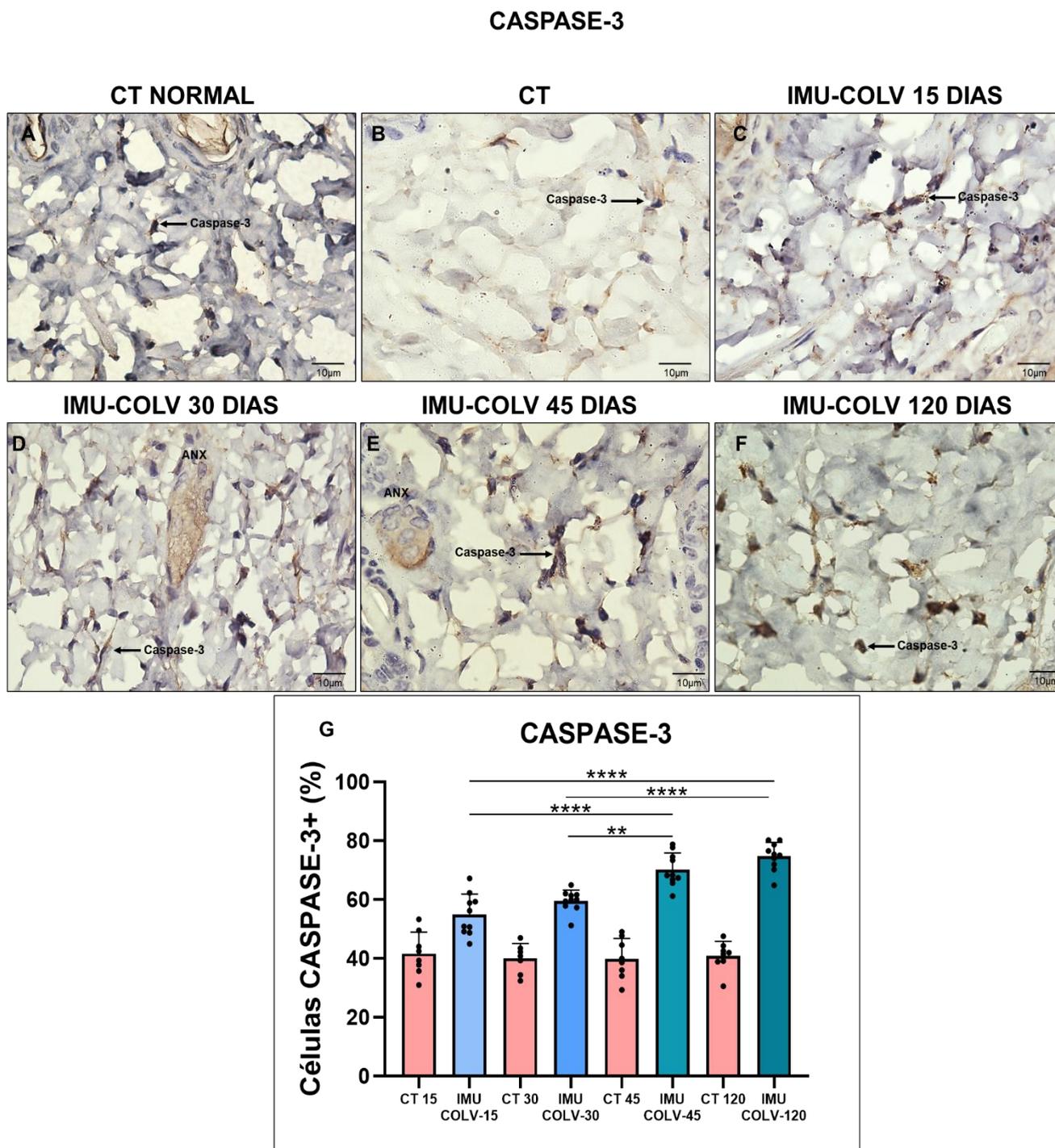


Figura 15 - Expressão de caspase-3 na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV, CT normal e CT. As células caspase-3-positivas são coradas em marrom (**setas**) (A-F). Observamos um aumento da expressão de caspase-3 nos grupos 45 e 120 dias (E-F), quando comparados ao grupo de 15 e 30 dias (C-D). (G) Representação gráfica da quantificação da expressão de caspase-3, identificando a diferença estatística entre os grupos IMU-COLV 15 e 45 dias (**** $p < 0,0001$); 15 e 120 dias (**** $p < 0,0001$); 30 e 45 dias (** $p = 0,0032$); 30 e 120 dias (**** $p < 0,0001$). *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelo pós-teste de Sidak.*

5.7 Análise da fibrilogênese e diferenciação de fibroblastos na pele durante o desenvolvimento do modelo de ES

Os resultados morfológicos e quantitativos apresentados nos itens anteriores, indicam que o processo de remodelamento do tecido cutâneo, no modelo experimental estudado, se inicia aos 45 dias após a imunização com Col V. Por esta razão, os resultados a seguir serão descritos nos grupos IMU-COLV 45 e IMU-COLV 120 dias. A **Figura 16 A-D**, confirma os resultados demonstrados nas **Figuras 8 e 9** no que se refere ao seu padrão fibrilar e distribuição do colágeno dos tipos I e III no grupo IMU-COLV 45 dias. Entretanto, quando colocamos o Col I e o Col III (**Figura 16 E-G**) no grupo IMU-COLV 45 dias, verificamos aumento na interação entre as fibras do colágeno dos tipos I e III, sugerindo que o processo de remodelamento tecidual ocorre 45 dias após a indução da ES com Col V. Na **Figura 16 G** evidenciamos o Col I, com padrão fibrilar fragmentado, unido ao **Col III**, resultando em fibras mais espessas e desorganizadas na derme papilar do grupo IMU-COLV 45 dias.

Da mesma forma, na **Figura 16 A-D**, quando imunomarcamos o Col I e o Col V, obtemos o mesmo padrão fino, indicado na descrição da **Figura 8 A-F** e da **Figura 9 A-F**. Por outro lado, quando colocamos o Col I e o Col V, observa-se aumento da interação entre as duas fibras, resultando em espessamento das mesmas, com importante formação de uma malha fibrilar densa, que se expande em toda derme papilar do grupo IMU-COLV 45 dias (**Figura 17 E-G**). Salienta-se que o Col I de padrão fragmentado, encontrado nos animais do grupo IMU-COLV 45 dias (**Figura 17 A**), está em boa parte associado a fibras de Col V (**Figura 17 G**), o que poderia interferir na formação da matriz fibrilar da pele e na sua função.

No grupo IMU-COLV 45 dias, a colocação de células positivas para α -actina do músculo liso (α -AML) com Col I, mostrou pequena positividade para α -AML na parede dos vasos e capilares, além de intensa expressão de Col I, com aspecto fragmentado, neste grupo (**Figura 18 A, C, E e G**), quando relacionado ao grupo CT (**Figura 18 B, D, F e H**). Por outro lado, quando analisamos no grupo IMU-COLV 45 dias, a colocação de células positivas para α -AML e o Col V, identificamos aumento da expressão desta proteína na região dermo-

epidérmica e circundando os anexos cutâneos. Nessas regiões também observamos intensa reatividade da α -AML, sugerindo que células α -AML⁺, estariam participando do remodelamento da pele do grupo IMU-COLV 45 dias (**Figura 19 C, E e G**), quando comparamos com o seu respectivo controle (**Figura 19 D, F e H**).

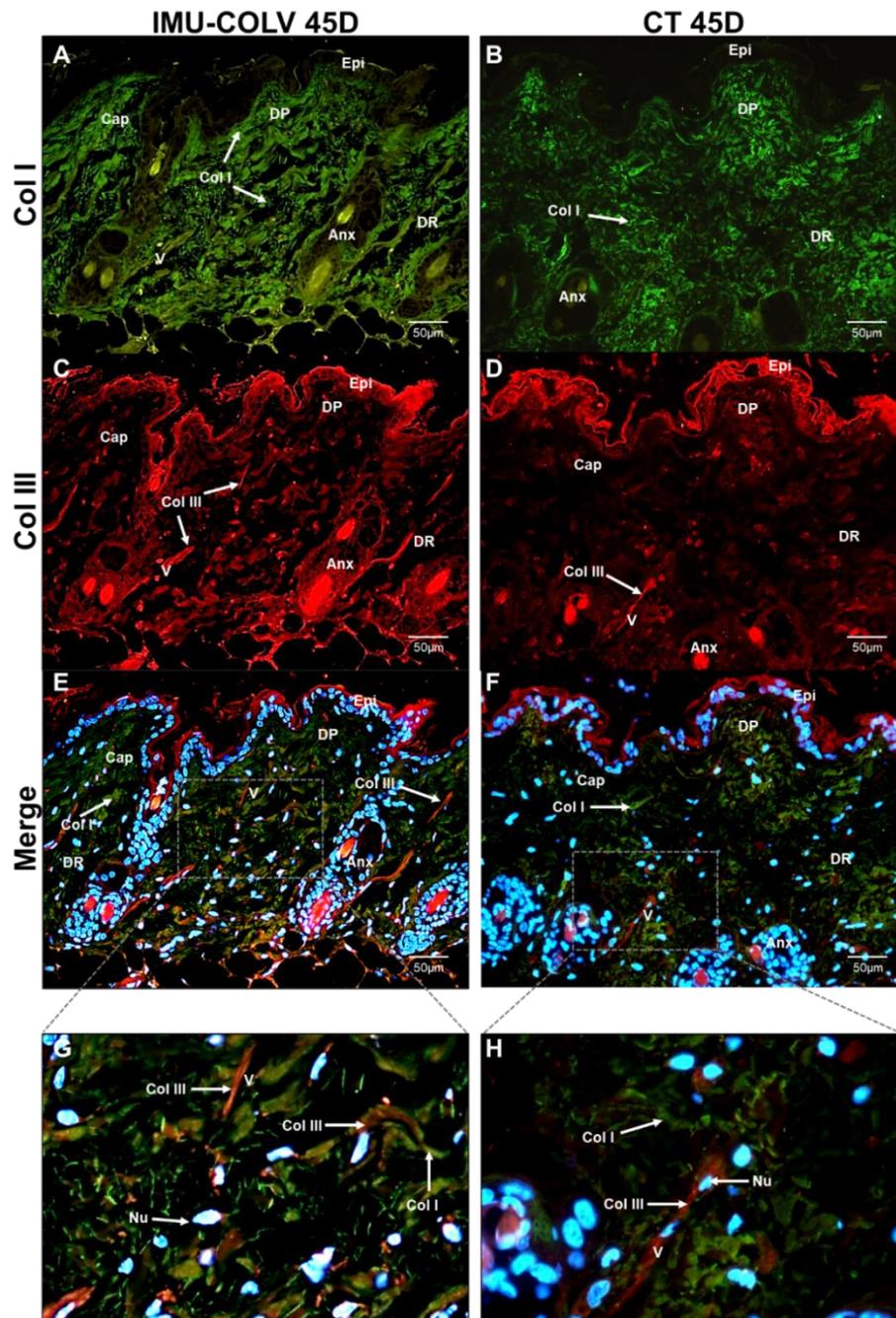


Figura 16- Imagens representativas da colocalização do colágeno dos tipos I (Col I) e III (Col III) imunomarcados na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV 45 dias e CT-45dias. Em **(A)** identificamos em verde fluorescente a distribuição das fibras de colágeno do tipo I (Col I) ocupando a derme papilar e reticular no grupo IMU-COLV 45 dias. Notar o intenso espessamento das fibras de colágeno I (**setas**) na derme papilar (DP) e reticular (DR) e circundando os anexos cutâneos (Anx). Notar um importante sinal de fragmentação das fibras de colágeno do tipo I (**seta**) localizadas preferencialmente em lacunas do tecido cutâneo, entre as fibras espessas do colágeno I, quando comparamos ao grupo CT- 45 dias **(B)**. Em **(C)**, identificamos um aumento do sinal fluorescente vermelho para o colágeno do tipo III (Col III), distribuído na derme papilar (DP), reticular (DR) e circundando vasos (V), capilares (Cap) e anexos (Anx) no grupo IMU-COLV 45 dias, quando comparado ao grupo CT-45dias **(D)**. Em **(E e G)** observamos aumento da frequência de fibras compostas de colágeno I e III, em vermelho-alaranjado, processo mais tênue na pele dos animais do grupo CT-45dias **(F e H)**. (*Aumento 400X*) **(G e H, detalhes ampliados)** Núcleos das células corados com DAPI (*Nu*).

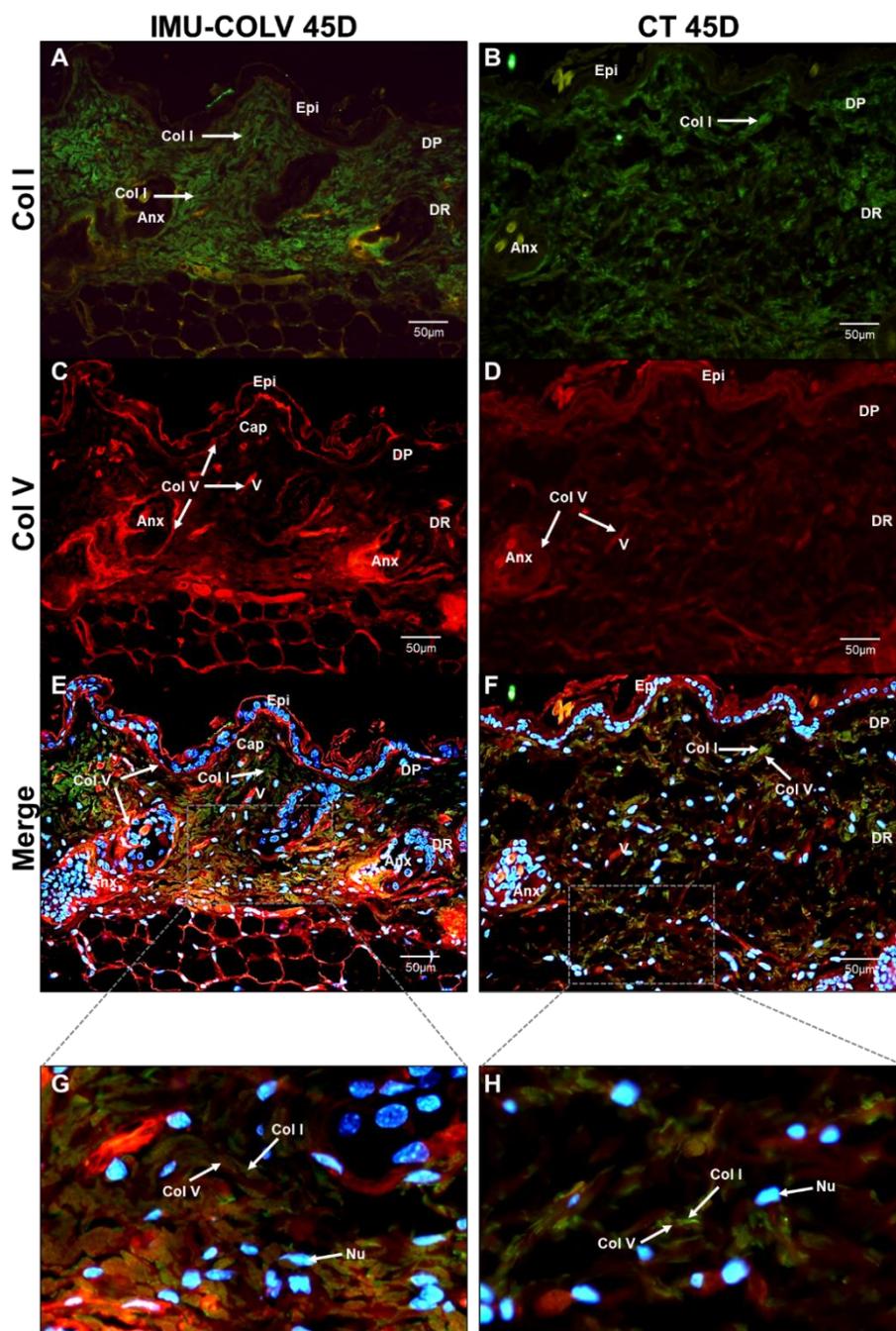


Figura 17- Micrografias representativas da colocalização do colágeno dos tipos I (Col I) e V (Col V) imunomarcados na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV 45 dias e CT-45dias. Em **(A)** observamos em verde a expressão das fibras de colágeno do tipo I (Col I) na derme papilar (DP) e reticular (DR) no grupo IMU-COLV 45 dias. Identificamos intensa fluorescência para colágeno I (seta) na derme papilar (DP), reticular (DR) e nos anexos cutâneos (Anx). Fragmentação das fibras de colágeno I também foram observados na derme (seta) entre as fibras espessas do colágeno I, quando comparamos ao grupo CT- 45 dias **(B)**. Em **(C)**, identificamos aumento da fluorescência (vermelho) para o colágeno do tipo V (Col V), distribuído na região dermo-epidérmica da pele e na parede dos vasos (V), da derme papilar (DP) e reticular (DR), capilares (Cap) e anexos (Anx) do grupo IMU-COLV 45 dias em relação ao grupo CT-45dias **(D)**. Em **(E e G)** observamos em vermelho-alaranjado, aumento da formação de fibras compostas por colágeno I e V, quando comparamos ao grupo CT-45dias **(F e H)**. (*Aumento 400X*) **(G e H, detalhes ampliados)** Núcleos das células corados com DAPI (Nu).

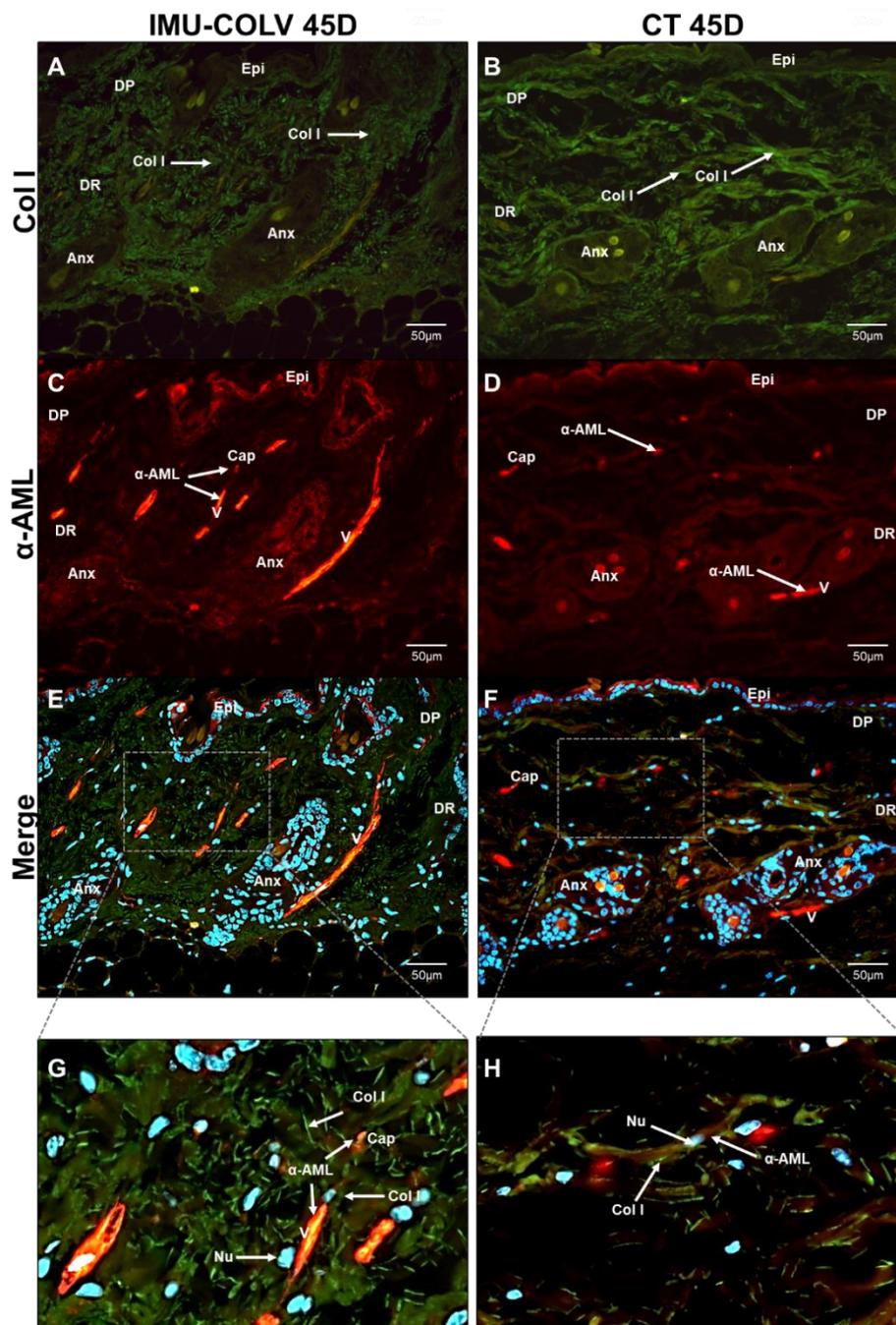


Figura 18- Imunofluorescência da colocalização do colágeno I (Col I) e da alfa actina de músculo liso (α -AML) na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV 45 dias e CT-45 dias. Em **(A)** identificamos (verde) a expressão do colágeno do tipo I obedecendo um padrão heterogêneo associado à fragmentação fibrilar, distribuído na derme papilar (DP) e reticular (DR) do grupo IMU-COLV 45 dias, quando comparados ao grupo CT- 45 dias **(B)**. Em **(C)**, demonstramos um aumento da fluorescência (vermelho) para α -AML, que se apresenta mais evidente no citoplasma das células da parede de vasos, na camada subepitelial dos anexos cutâneos (Anx). No grupo CT-45 dias **(D)** identificamos a α -AML na parede de vasos (V), capilares dérmicos (Cap) e ausência nos anexos cutâneos (Anx). A colocalização do Col I/ α -AML **(E e G)**, mostra na derme papilar (DP) e reticular (DR) do grupo IMU-COLV 45 dias, áreas comuns com intensa fragmentação e expressão de colágeno I e de α -AML, que difere do padrão da matriz fibrilar e da tênue expressão de α -AML no grupo CT-45 dias **(F e H)**. (*Aumento 400X*) **(G e H, detalhes ampliados)**. Núcleos das células corados com DAPI (Nu).

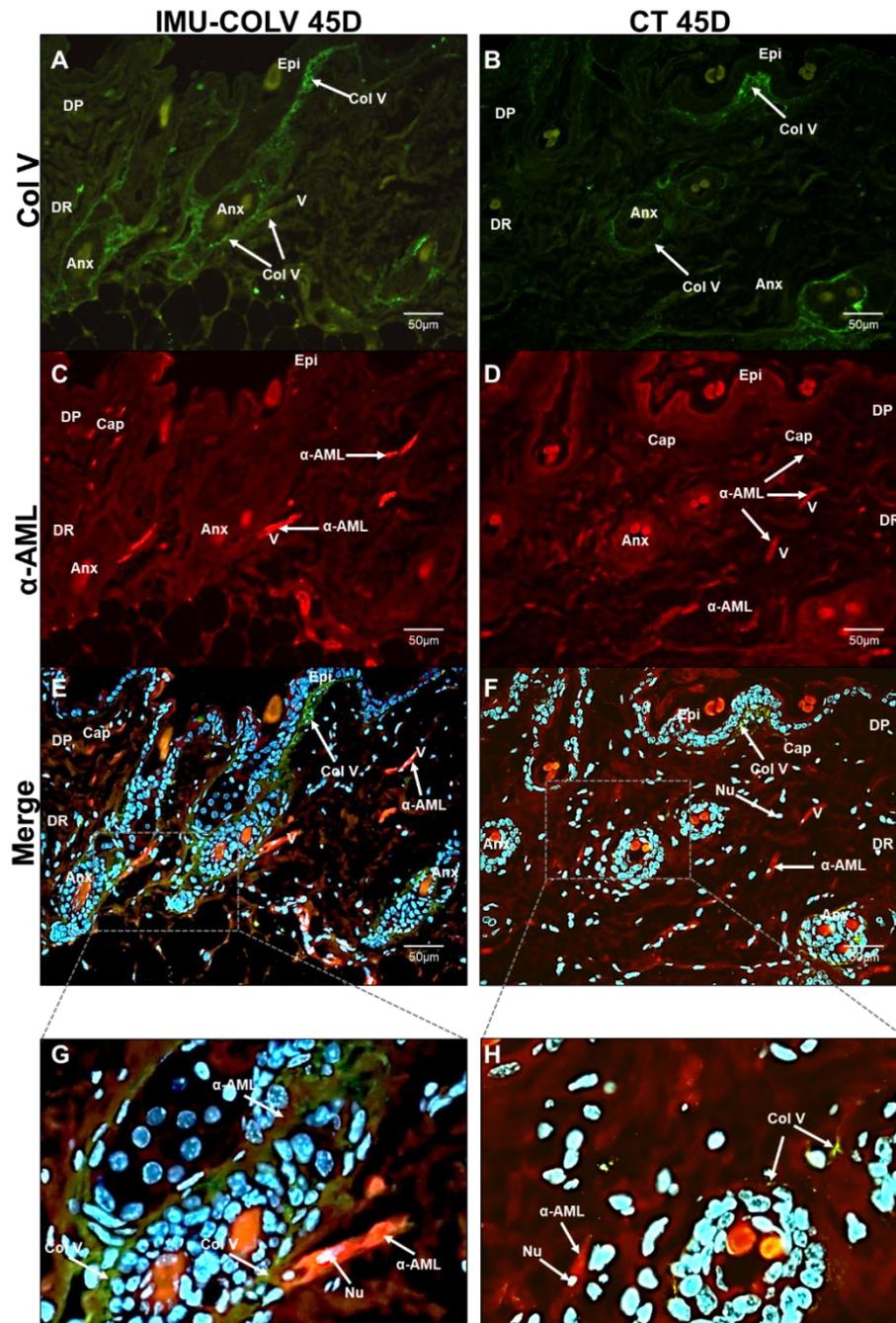


Figura 19 - Imunofluorescência da colocalização do colágeno V (Col V) e da alfa actina de músculo liso (α -AML) na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV 45 dias e CT-45 dias. Em **(A)** identificamos (verde) a expressão do colágeno do tipo V (**Col V**) na região dermo-epidérmica do tecido cutâneo, na parede dos vasos (**V**) e intenso depósito envolvendo os anexos cutâneos no grupo IMU-COLV 45 dias, quando comparamos com o grupo CT-45 dias **(B)**. Em **(C)**, demonstramos um aumento da fluorescência (vermelho) para α -AML, que se apresenta mais evidente no citoplasma das células da parede de vasos (**V**), na camada subepitelial dos anexos cutâneos (**Anx**). No grupo CT-45 dias **(D)** identificamos a α -AML na parede de vasos (**V**), capilares dérmicos (**Cap**) e ausência nos anexos cutâneos (**Anx**). A colocalização do Col V/ α -AML **(E e G)**, mostra na derme papilar (**DP**) do grupo IMU-COLV 45 dias, intensa expressão de colágeno V e de α -AML, na região dermo-epidérmica e no subepitélio dos anexos cutâneos, quando comparamos com o grupo CT-45 dias **(F e H)**. **(Aumento 400X) (G e H detalhes ampliados)**. Núcleos das células corados com DAPI (**Nu**).

Ainda, quando analisamos a colocalização do Col I e Col III (**Figura 20 E-G**), no grupo IMU-COLV 120 dias, evidenciamos a fluorescência para os dois tipos de colágeno juntos, sugerindo uma forte interação entre as fibras e início do processo de remodelamento tecidual, o que não é observado no grupo CT (**Figura 20 F-H**). No grupo IMU-COLV 120 dias, o padrão morfológico do Col I (**Figura 20 A**) e do Col III (**Figura 20 C**), também obedeceram ao mesmo padrão fibrilar descrito na (**Figura 8 F**) e (**Figura 9 F**), entretanto, na **Figura 20 G**, observamos que o Col I de padrão fibrilar fragmentado ocupa a mesma localização das fibras de Col III, resultando em uma rede densa e desorganizada na derme papilar, constituída de Col I e Col III, indicando o desenvolvimento do processo fibrótico na derme, no grupo IMU-COLV 120 dias (**Figura 20 E e G**).

Na **Figura 21 E e G**, observamos que a rede densa composta de Col I (**Figura 20 A**) e Col III (**Figura 20 C**), também é constituída de fibras de Col V, principalmente nas regiões de intensa fragmentação do Col I (**Figura 21 A, E e G**), o que não ocorre no grupo CT (**Figura 21 B, F e H**). No que refere ao padrão fibrilar do Col I (**Figura 21 A**) e do Col V (**Figura 21 C**), foi sustentado o mesmo padrão descrito na (**Figura 8 F**) e (**Figura 9 F**).

Quando avaliamos, no grupo IMU-COLV 120 dias, a colocalização de células positivas para α -AML e Col I, observamos intensa positividade para α -AML na parede dos vasos e capilares (**Figura 22 C**), em comparação ao grupo CT (**Figura 22 D**), além de aumento na expressão do Col I, predominantemente envolvendo os anexos cutâneos da derme reticular (**Figura 22 A**), quando comparamos ao grupo CT (**Figura 22 B**), sugerindo mais uma vez a participação dos miofibroblastos (α -AML⁺) na evolução do processo de remodelamento cutâneo nos animais do grupo IMU-COLV 120 dias. Analisando a imunomarcação para células α -AML⁺ e o Col V, no grupo IMU-COLV 120 dias, detectamos α -AML⁺ envolvidas pelas fibras de Col V (**Figura 23 E e G**), o que não observamos no grupo CT (**Figura 23 F e H**).

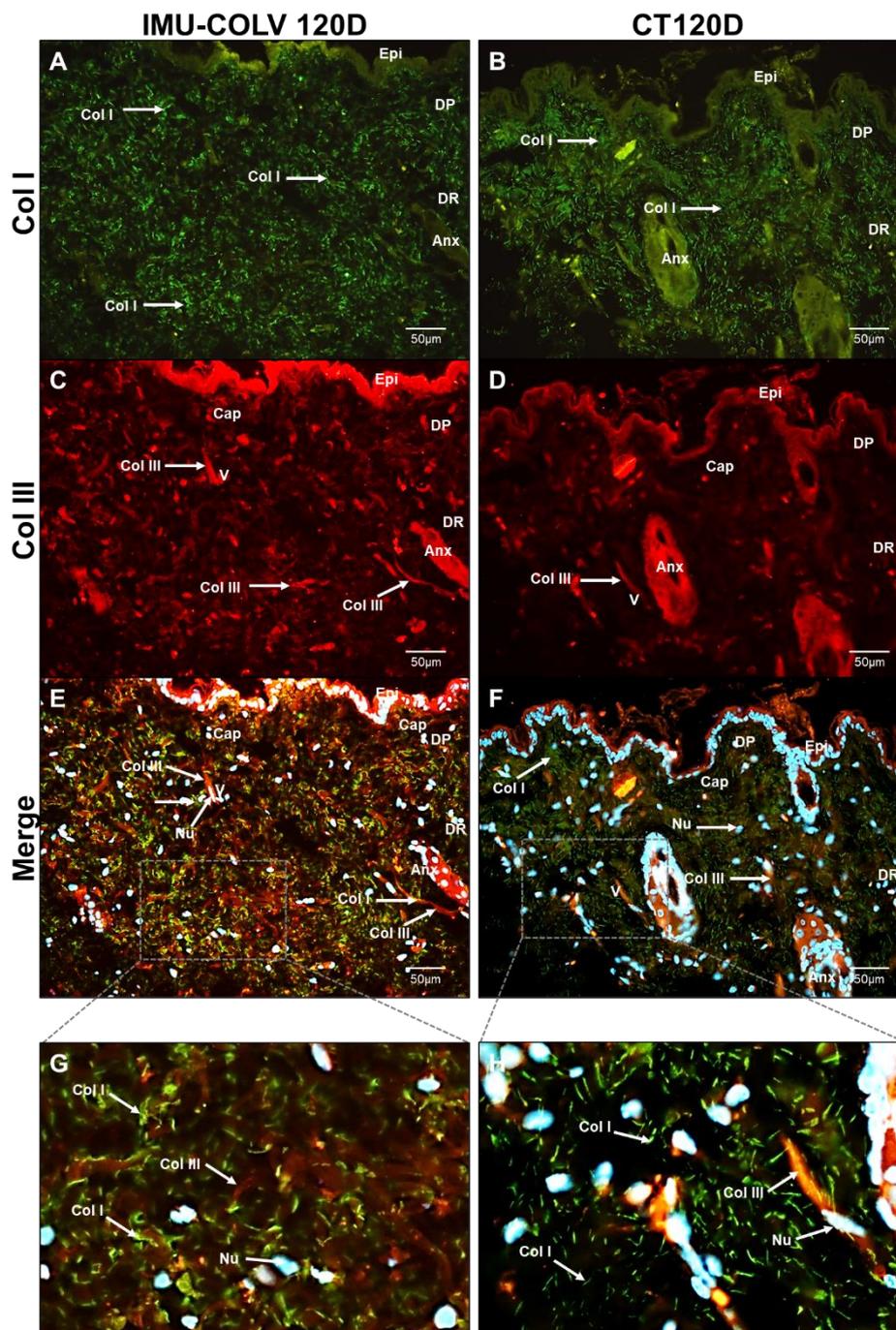


Figura 20 – Imagens representativas da colocalização do colágeno dos tipos I (Col I) e III (Col III) imunomarcados na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV 120 dias e CT-120 dias. Em **(A)** identificamos em verde fluorescente a distribuição das fibras de colágeno do tipo I (**Col I**) ocupando a derme papilar e reticular no grupo IMU-COLV 120 dias. Notar o aumento da expressão das fibras de colágeno I (**Col I**) (**setas**) na derme papilar (**DP**) e reticular (**DR**), formando uma rede densa composta de fibras fragmentadas de colágeno I, quando comparamos ao grupo CT- 120 dias **(B)**. Em **(C)**, identificamos um aumento do vermelho fluorescente na derme papilar (**DP**) e reticular (**DR**), que se intensifica na parede de vasos (**V**), capilares (**Cap**) e anexos (**Anx**) no grupo IMU-COLV 120 dias, quando comparado ao grupo CT-120dias **(D)**. Em **(E e G)** mostramos aumento da formação de fibras constituídas de colágeno dos tipos I (**Col I**) e III (**Col III**), em verde-alaranjado, processo que se intensifica no grupo IMU-COLV 120 dias, em relação ao grupo CT-120 dias **(F e H)**. (**Aumento 400X**) (**G e H detalhes ampliados**). Núcleos das células corados com DAPI (**Nu**).

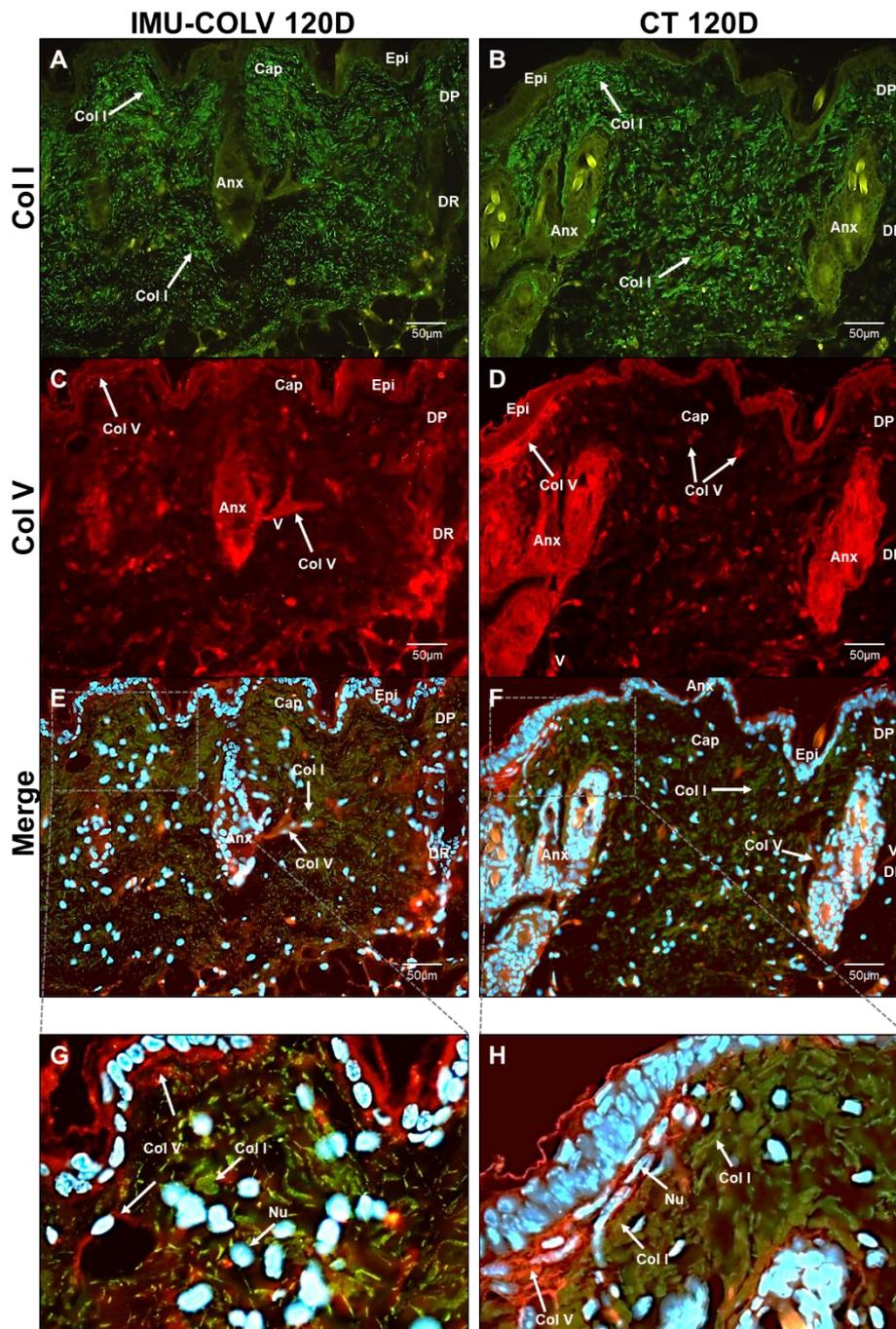


Figura 21 - Imagens representativas da colocalização do colágeno dos tipos I (**Col I**) e V (**Col V**) imunomarcados na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV 120 dias e CT-120 dias. Em **(A)** observamos em verde fluorescente a expressão das fibras de colágeno do tipo I (**Col I**) na derme papilar (**DP**) e reticular (**DR**) no grupo IMU-COLV 120 dias. Identificamos intensa fluorescência para colágeno I (**seta**) na derme papilar (**DP**), reticular (**DR**) e aumento acentuado da fragmentação das fibras de colágeno I (**seta**) entre as fibras mais espessas do colágeno I, quando comparamos ao grupo CT-120 dias (**B**). Em **(C)**, observamos aumento da fluorescência (vermelho) para o colágeno do tipo V (**Col V**), distribuído na região dermo-epidérmica da pele e na parede dos vasos (**V**), da derme papilar (**DP**) e reticular (**DR**), capilares (**Cap**) e anexos (**Anx**) do grupo IMU-COLV 120 dias em relação ao grupo CT-120 dias (**D**). Em **(E e G)** observamos em vermelho-alaranjado, aumento da formação de fibras compostas por colágeno I e V, quando comparamos ao grupo CT-120 dias (**F e H**). (**Aumento 400X**) (**G e H detalhes ampliados**). Núcleos das células corados com DAPI (**Nu**).

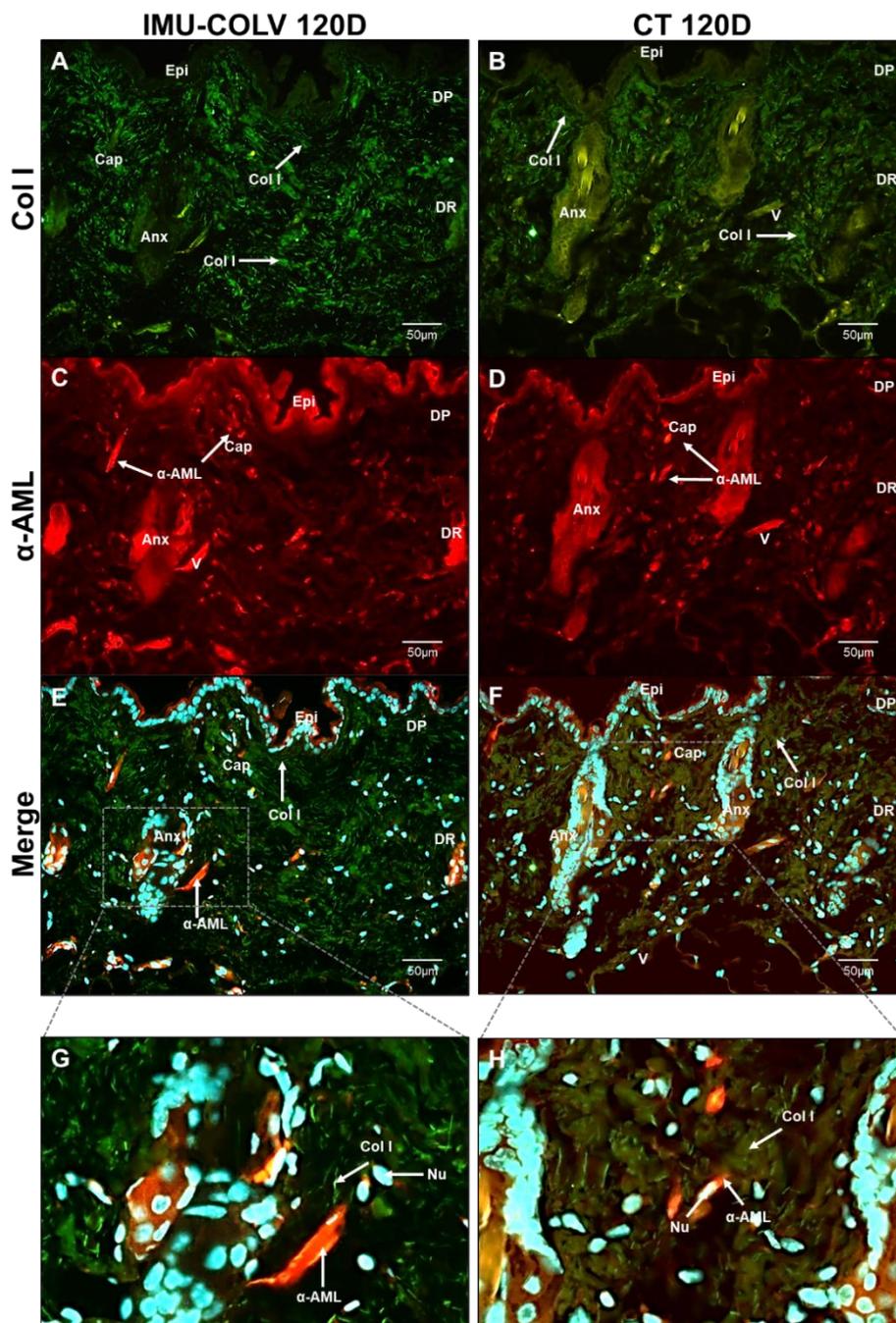


Figura 22 - Imunofluorescência da colocalização do colágeno I (**Col I**) e da alfa actina de músculo liso (**α-AML**) imunomarcados na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV 120 dias e CT-120 dias. Em **(A)** identificamos (verde) a expressão do colágeno do tipo I obedecendo um padrão heterogêneo associado à fragmentação fibrilar, distribuído na derme papilar (**DP**) e reticular (**DR**) do grupo IMU-COLV 120 dias, quando comparados ao grupo CT- 120 dias **(B)**. Em **(C)**, demonstramos um aumento da fluorescência (vermelho) para α-AML, que se apresenta mais evidente no citoplasma das células da parede de vasos, na camada subepitelial dos anexos cutâneos (**Anx**). No grupo CT-120 dias **(D)** identificamos a α-AML na parede de vasos (**V**), capilares dérmicos (**Cap**) e nos anexos cutâneos (**Anx**). A colocalização do Col I/ α-AML **(E e G)**, demonstra na derme papilar (**DP**) e reticular (**DR**) do grupo IMU-COLV 120 dias, áreas comuns com intensa fragmentação e expressão de colágeno I e de α-AML, quando comparamos ao grupo CT-120 dias **(F e H)**. **(Aumento 400X) (G e H detalhes ampliados)**. Núcleos das células corados com DAPI (**Nu**).

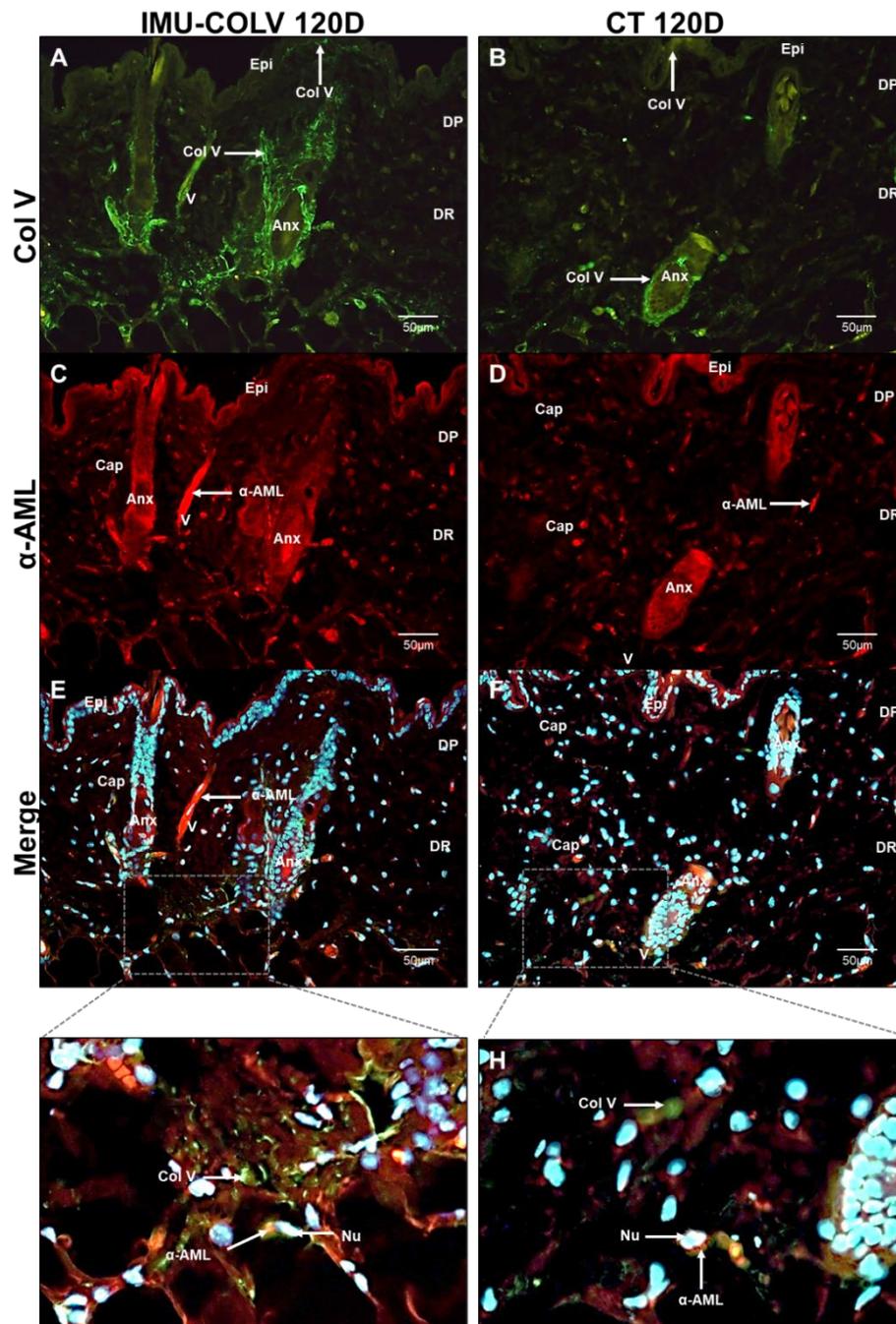


Figura 23- Imunofluorescência da colocalização do colágeno V (**Col V**) e da alfa actina de músculo liso (**α-AML**) imunomarcados na pele de camundongos dos grupos IMU-COLV 120 dias e CT-120 dias. Em **(A)** observamos em verde fluorescente a intensa expressão do colágeno do tipo V (**Col V**) na região dermo-epidérmica do tecido cutâneo, na parede dos vasos (**V**) e intenso depósito envolvendo os anexos cutâneos no grupo IMU-COLV 120 dias, quando comparamos com a tênue expressão no grupo CT- 120 dias **(B)**. Em **(C)**, demonstramos um aumento da fluorescência (vermelho) para α-AML, que se apresenta mais evidente no citoplasma das células da parede de vasos (**V**), nos anexos cutâneos (**Anx**) e capilares dérmicos (**Cap**) e ausência nos anexos cutâneos (**Anx**). No grupo CT-120 dias **(D)** identificamos a α-AML na parede de vasos (**V**), capilares dérmicos (**Cap**) e ausência nos anexos cutâneos (**Anx**). A colocalização do Col V/ α-AML **(E e G)**, mostra na derme papilar (**DP**) do grupo IMU-COLV 120 dias, intensa expressão de colágeno V e de α-AML, nos vasos (**V**) e nos anexos cutâneos (**Anx**), quando comparamos com o grupo CT-120 dias **(F e H)**. (**Aumento 400X**) (**G e H detalhes ampliados**). Núcleos das células corados com DAPI (**Nu**).

5.8 Avaliação da expressão das proteínas da matriz extracelular em fibroblastos dérmicos do modelo IMU-COLV

Os fibroblastos reproduzem importantes alterações moleculares, responsáveis pelo fenótipo pró-fibrótico observado na ES, portanto analisamos *in vitro* essas células, provenientes do tecido cutâneo do grupo IMU-COLV 120 dias. Na **Figura 24 (A-B)** mostrou-se a expressão, evidenciada pela fluorescência, de Col I e Col III nos fibroblastos dérmicos do IMU-COLV 120 dias, com um padrão granular citoplasmático. Além disso, observa-se uma intensa marcação do Col V, com padrão granular, que se estende em todo o citoplasma dos fibroblastos (**Figura 24 C**). Ainda, na **Figura 24 D** observa-se uma intensa marcação para α -AML, em todo citoplasma das células.

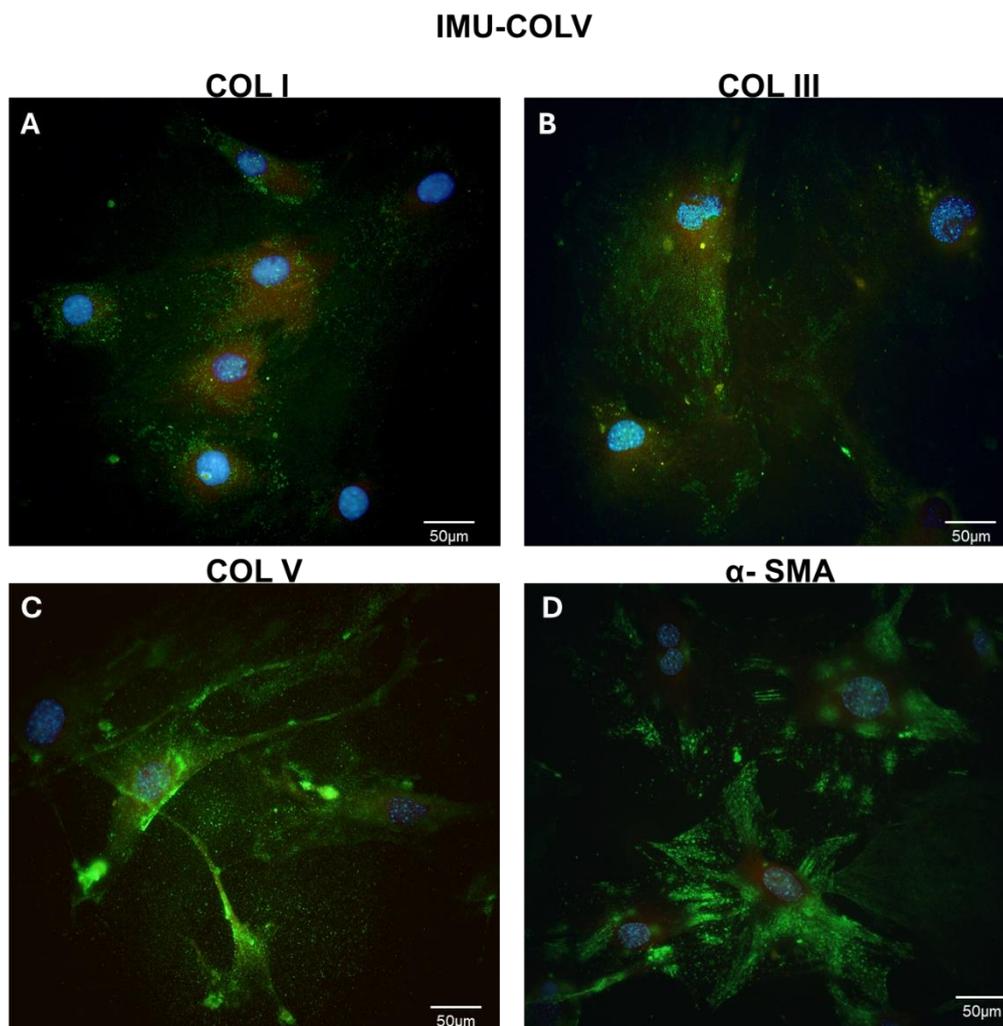


Figura 24 - Expressão do Col I, Col III, Col V e α -SMA em fibroblastos de pele do grupo IMU-COLV 120 dias. A imunofluorescência em verde mostra a expressão dessas proteínas no citoplasma dos fibroblastos. Os núcleos das células são visualizados em azul, corados com DAPI.

5.9 Análise da expressão das proteínas da matriz extracelular em fibroblastos dérmicos estimulados com Col V

Para avaliar a ação do Col V na fibrilogênese da pele, foram realizados ensaios *in vitro*, com cultura de fibroblastos cutâneos de camundongo controle, estimulados com diferentes concentrações de Col V (25 µg/ml, 50 µg/ml e 100 µg/ml), por 24 e 48 horas. Ainda, a expressão de colágeno dos tipos I, III e V em cultura foi avaliada por imunofluorescência indireta.

Após 24 horas do estímulo com Col V, não houve diferença na expressão do Col I. Entretanto, observou-se maior expressão de Col I após 48 horas, com 98% das células positivas, quando os fibroblastos foram estimulados com Col V, na concentração de 25 µg/ml ($568,8 \pm 55,89$ vs $321,8$ vs $25,74$, $p = (p=0,0425)$). Já nas demais concentrações, 50 µg/ml e 100 µg/ml, não houve diferença na expressão de Col I (**Figura 25**).

Após 24 horas, o Col III foi expresso por 99% das células, sendo a expressão aumentada, de um modo dose dependente do estímulo dos fibroblastos com Col V, para as concentrações de 25 µg/ml ($3262,0 \pm 348,3$ vs $614,0 \pm 64,90$, $p = 0,0125$) e 50 µg/ml ($4941,0 \pm 557,7$ vs $614,0 \pm 64,90$, $p=0,0030$). Em 48 horas após o estímulo com Col V, também houve aumento de Col III, de modo dose dependente, nas concentrações de 25 µg/ml ($4330,0 \pm 416,2$ vs $501,3 \pm 24,89$, $p = 0,0003$), 50 µg/ml ($6903,0 \pm 55,89$ vs $501,3 \pm 24,89$, $p < 0,0001$) e 100 µg/ml ($8063,0 \pm 169,3$ vs $501,3 \pm 24,89$, $p < 0,0001$); sendo respectivamente, 99%, 100% e 100% a porcentagem de células positivas para Col III (**Figura 26**).

Em relação à expressão do Col V, houve aumento após 24 horas, sendo dose dependente nas concentrações de 25 µg/ml ($4279,00 \pm 327,1$ vs $1716,0 \pm 0,000$, $p = 0,0116$) e 50 µg/ml ($5562,0 \pm 530,4$ vs $1716,0 \pm 0,000$, $p=0,0036$), com 99% de células positivas para ambas as concentrações. Também houve um aumento na expressão de Col V, após 48 horas do estímulo, nas concentrações de 25 µg/ml ($5804,0 \pm 600,2$ vs $1887,0 \pm 86,05$, $p = 0,0254$), 50 µg/ml ($7315,0 \pm 342,0$ vs $1887,0 \pm 86,05$, $p=0,0079$) e 100 µg/ml ($8901,0 \pm 1407,0$ vs $1887,0 \pm 86,05$, $p=0,0030$), com 99% de células positivas para todas as concentrações (**Figura 27**). Além disso, é possível observar pelas imagens representativas, que

tanto o Col III (**Figura 26 C-D**) quanto o Col V (**Figura 27 C-D**) mudaram a sua conformação, formando uma “espécie” de agregado de fibras nas maiores concentrações.

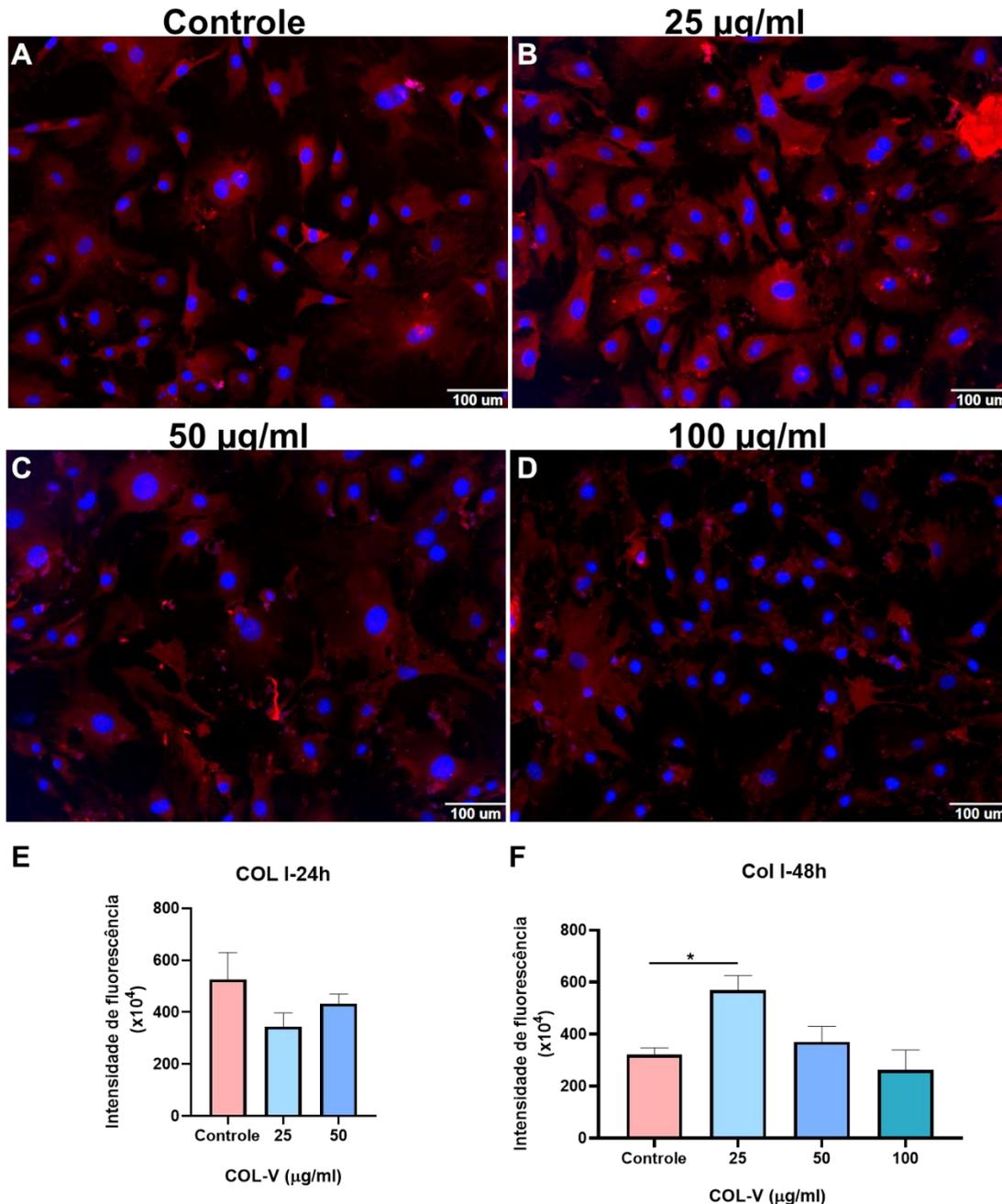


Figura 25 - Expressão de colágeno tipo I em fibroblastos de pele de camundongo controle, estimulados com Col V. A imunofluorescência em vermelho mostra a expressão de colágeno tipo I no citoplasma de fibroblastos não estimulados com Col V (controle) **(A)** e estimulados com as concentrações de 25 µg/ml **(B)**, 50 µg/ml **(C)** e 100 µg/ml **(D)** de Col V. Os núcleos das células são visualizados em azul, corados com Hoechts 33342. Os gráficos da análise da expressão de Colágeno I, após 24 **(E)** e 48 **(F)** horas de estímulo dos fibroblastos com Col V, mostram que a expressão de colágeno tipo I é tempo dependente, observando-se maior expressão de Colágeno tipo I, após 48 horas de incubação com uma concentração de 25µg/ml de Col V (*p=0,0425) **(F)**.

Análise estatística foi realizada por *GraphPad Prism versão 8*; *Anova one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*.

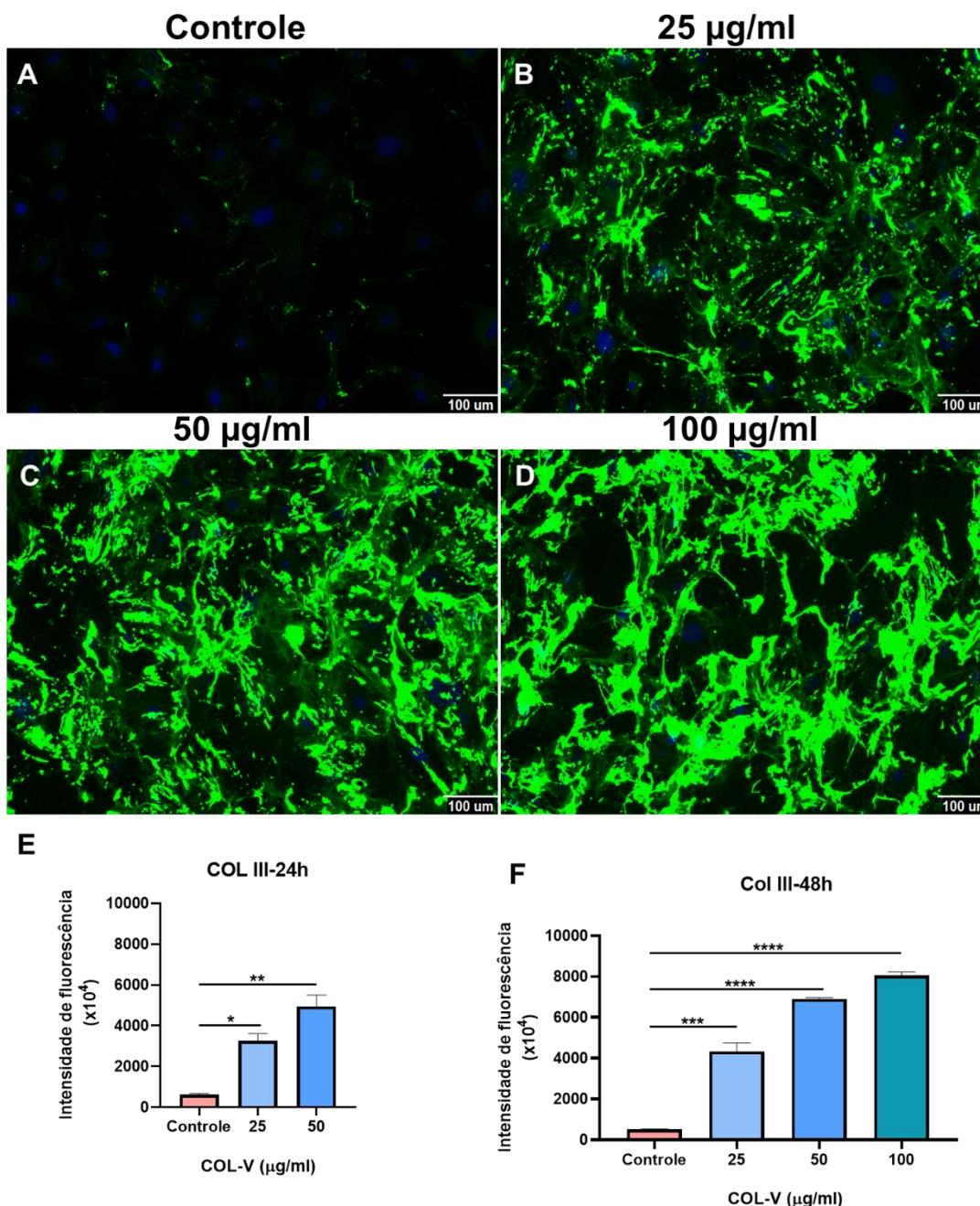


Figura 26 - Expressão de Colágeno tipo III em fibroblastos de pele de camundongo controle, estimulados com Col V. A imunofluorescência em verde mostra a expressão de colágeno tipo III no citoplasma de fibroblastos não estimulados com Col V (controle) (A) e estimulados com as concentrações de 25 µg/ml (B), 50 µg/ml (C) e 100 µg/ml (D) de Col V. Os núcleos das células são visualizados em azul, corados com Hoechts 33342. Os gráficos da análise da expressão de colágeno III após 24 (E) e 48 (F) horas de estímulo dos fibroblastos com Col V, mostram que a expressão de colágeno tipo III, aumenta após 24 horas e é dose dependente (24horas: 25 µg/ml (*p=0,0125) e 50 µg/ml (**p=0,0030); 48 horas: 25 µg/ml (**p= 0,0003), 50 µg/ml (****p<0,0001) e 100 µg/ml (****p <0,0001)). Análise estatística foi realizada por *GraphPad Prism versão 8*; *Anova one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*.

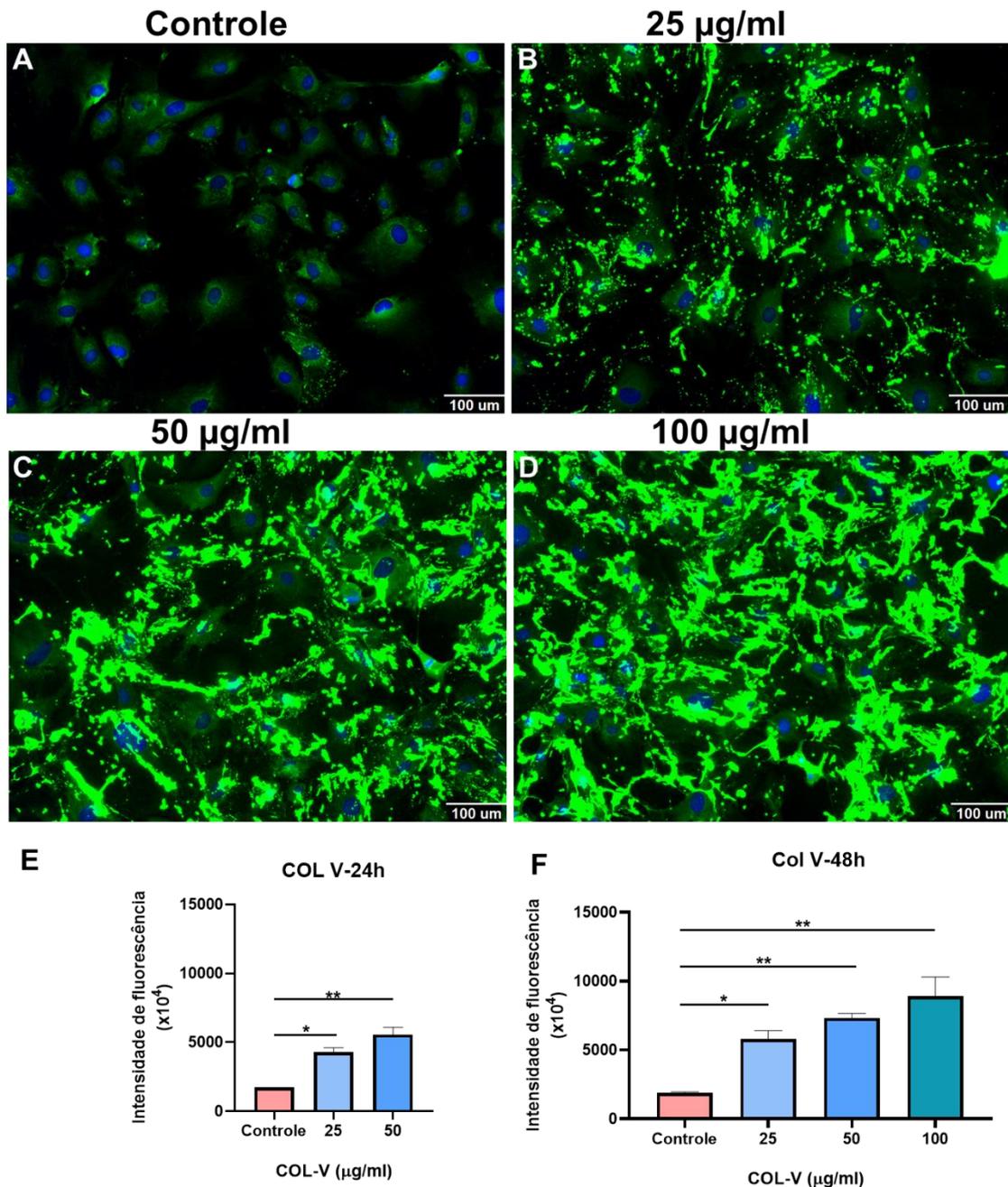


Figura 27 - Expressão de Col V em fibroblastos de pele de camundongo controle, estimulados com Col V. A imunofluorescência em verde mostra a expressão de Col V no citoplasma de fibroblastos não estimulados (controle) (A) e estimulados com as concentrações de 25 µg/ml (B), 50 µg/ml (C) e 100 µg/ml (D) de Col V. Os núcleos das células são visualizados em azul, corados com Hoechts 33342. Os gráficos da análise da expressão de Col V após 24 (E) e 48 (F) horas de estímulo de fibroblastos com Col V, mostram que a expressão desta proteína, aumenta após 24 horas e é dose dependente (24horas: 25 µg/ml (*p= 0,0116) e 50 µg/ml (**p=0,0036); 48 horas: 25 µg/ml (*p= 0,0254), 50 µg/ml (**p=0,0079) e 100 µg/ml (**p=0,0030)). Análise estatística foi realizada por *GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelo pós-teste de Tukey*.

5.10 Análise da expressão da proteína α -AML em fibroblastos dérmicos estimulados com Col V

A avaliação da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos através da imunomarcagem para α -AML, também foi realizada nos ensaios *in vitro*, na cultura de fibroblastos cutâneos de camundongo controle, estimulados com diferentes concentrações de Col V (25 μ g/ml, 50 μ g/ml e 100 μ g/ml), por 24 e 48 horas.

Foi possível observar que após 48 horas do estímulo houve um aumento da expressão de α -AML, na concentração de 25 μ g/ml ($568,80 \pm 55,89$ vs $321,80$ vs $25,74$, $p=0,0425$), sendo 99% das células positivas. Já para as demais concentrações 50 μ g/ml e 100 μ g/ml, não houve diferença. Além disso, em 24 horas após o estímulo com Col V não houve diferença na expressão de α -AML (**Figura 28**).

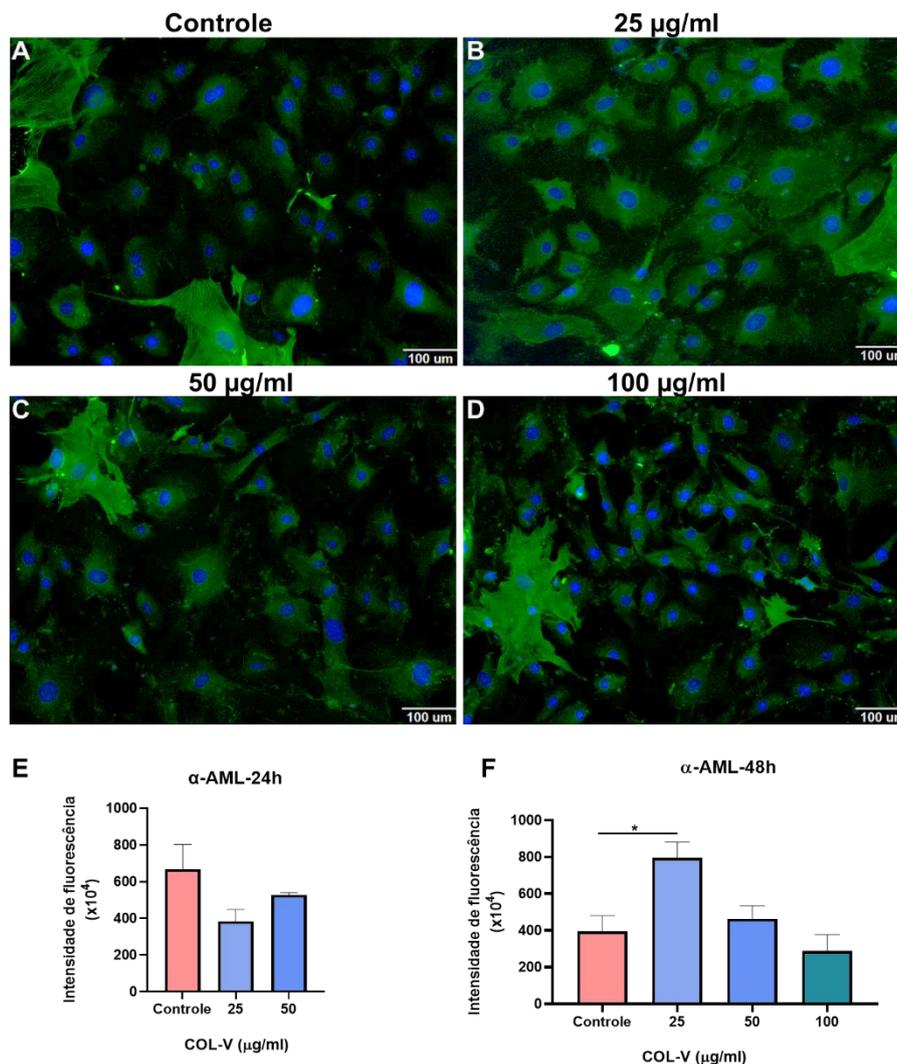


Figura 28 - Expressão da α -AML em fibroblastos de pele de camundongo controle. A imunofluorescência em verde mostra a expressão de α -AML no citoplasma de fibroblastos não estimulados com Col V (controle) (A) e estimulados com as concentrações de 25 μ g/ml (B), 50 μ g/ml (C) e 100 μ g/ml (D) de Col V. Os núcleos das células são visualizados em azul, corados com Hoechts 33342. Os gráficos da análise de fluorescência após 24 (E) e 48 (F) horas de estímulo de fibroblastos com Col V mostram que a expressão de α -AML é tempo dependente, observando-se uma máxima expressão de α -AML após 48 horas de incubação com uma concentração de 25 μ g/ml de Col V (* $p=0,0279$) (F). Análise estatística foi realizada por *GraphPad Prism* versão 8; Anova one way, seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.11 Manifestações Imunológicas

Quando avaliado a reatividade a componentes intracelulares por imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2, observou-se o desenvolvimento de resposta imunológica a antígenos intracelulares, com 100%

de positividade para a presença de Fator Antinuclear (FAN) nos soros obtidos em 30, 45 e 120 dias após a imunização, contra 28,57% de positividade nos soros dos animais controle (**Figura 29**).

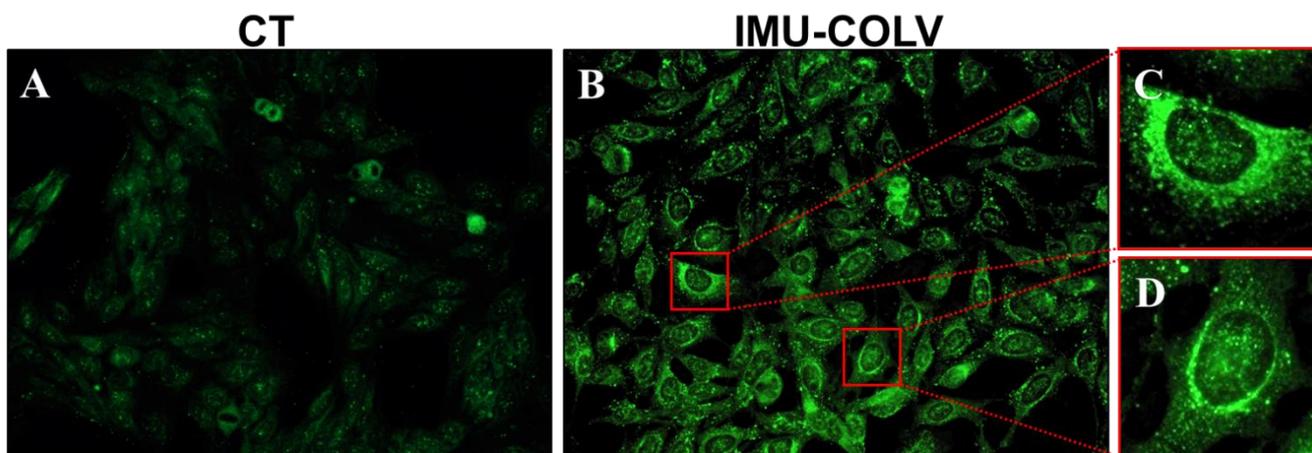


Figura 29 - Padrões representativos da pesquisa de Fator Antinuclear (FAN) por imunofluorescência indireta em células HEP-2. Quando comparados aos soros dos animais controle (**A**), os soros de animais imunizados (**B**) apresentaram uma fluorescência intensa, obedecendo a um padrão mais citoplasmático, com marcação densa (**C**) ou com pontilhados grossos e finos (**D**).

6. DISCUSSÃO

A hipótese predominante da patogênese das doenças fibróticas, como a ES, é que a fibrose resulta de uma resposta exagerada e inadequada de reparo tecidual. Ainda, que a fibrose é a consequência da ação de agentes que causam a ativação de vias inflamatórias e processos de cicatrização de feridas, resultando no influxo e ativação de células inflamatórias e fibroblastos, liberação de mediadores pró-fibróticos e proteínas da MEC. Apesar dos grandes avanços para se esclarecer a patogênese da ES, os fatores que levam à desregulação persistente da inflamação e da fibrose permanecem pouco compreendidos, o que dificulta o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, se insere os modelos animais “*in vivo*” e “*in vitro*”.

No presente estudo, demonstramos que, após 45 dias de imunização com Col V, os animais desenvolvem fibrose na pele constituída de colágeno dos tipos I e III, além de grandes quantidades de Col V. Essa desproporção do Col V na formação das fibras colágenas, pode ser resultante não só de mecanismos de ativação das proteínas da matriz, mas também por propriedades bioquímicas e moleculares que o Col V apresenta, levando à diferenciação dos fibroblastos e consequentemente alterando a produção de colágeno, que é a principal característica da ES(69).

O modelo experimental de ES induzido pela imunização com Col V em camundongos C57BL/6 foi estabelecido por Teodoro e col. em 2019, demonstrou que, após 120 dias de imunização, os animais, apresentaram alterações histológicas, imunológicas e vasculares semelhantes a ES humana (67–69,71,91). Foi sugerido que essas alterações eram resultantes do depósito de imunocomplexos circulantes (colágeno V - anticolágeno V) na superfície endotelial, ocasionando lesão endotelial, que expõem o Col V localizado logo abaixo da membrana basal, anteriormente oculto, o qual atuaria como neoantígeno, contribuindo para o processo inflamatório e caracterizando a autoimunidade (68,91).

Baseado nessa hipótese, foram avaliadas as alterações cutâneas durante a evolução desse modelo experimental, bem como os mecanismos de ação do Col V sobre a indução da fibrose tecidual. No modelo IMU-COLV 15 dias, não

foram observadas alterações morfológicas na pele. No entanto, a partir de 30 dias, observa-se o início da diminuição da camada de adipócitos. A evolução desse processo resulta após 45 e 120 dias em espessamento da pele, formação de agregados de fibras de colágeno diminuição da camada adiposa, atrofia de anexos cutâneos e espessamento da parede vascular. A avaliação da progressão desses eventos, com o tempo de imunização, é de grande importância para o estudo não só da patogênese da ES, mas para intervir nas terapias preventivas na doença em humanos.

Até o momento, o modelo de ES induzido pela bleomicina em camundongos é um dos mais utilizados para o estudo de fibrose cutânea. Yamamoto e col., em 2010, desenvolveram esse modelo murino por injeções subcutâneas diárias de bleomicina, durante um período de 4 semanas (72). Nesse modelo, as alterações cutâneas são geralmente localizadas na área ao redor do local da injeção e permanecem pelo menos 6 semanas após a interrupção das injeções de bleomicina (13). No modelo IMU-COLV, o desenvolvimento da fibrose é diretamente proporcional ao tempo de imunização e não apresenta regressão do processo até 120 dias, após a primeira imunização. Ainda, utilizamos camundongos fêmeas para a indução do modelo, pois elas são mais suscetíveis às imunizações e porque a ES afeta preferencialmente mulheres, visto que os hormônios sexuais e sua variação cíclica durante os anos férteis têm impacto na resposta imune e, provavelmente, influenciam no predomínio da ES no sexo feminino (69,98).

Adicionalmente, os resultados bioquímicos da avaliação de 4-hidroxiprolina mostraram que o teor de colágeno total está aumentado no grupo IMU-COLV 45 dias, indicando que após 45 dias a pele já apresenta depósito de colágeno, como indicado pelos resultados histológicos. A 4-hidroxiprolina é um aminoácido que só está presente na sequência das cadeias do colágeno e é um método muito utilizado para quantificar colágeno tecidual em modelos experimentais de doenças fibróticas, como a ES (99).

Por outro lado, quando se avaliou a expressão dos colágenos fibrilares na derme do modelo IMU-COLV, foi observado um aumento significativo do colágeno dos tipos I e III no grupo IMU-COLV 120 dias, em relação aos grupos IMU-COLV 15 e 30 dias. O Col I apresentou um padrão fibrilar fragmentado,

unindo-se às fibras finas de Col III, e apresentando fibras mais espessas e desorganizadas na derme. Esse resultado sugere uma forte ligação entre eles e o estabelecimento da fibrose. Ainda, mais uma vez consagrando nossa ideia, observou-se um aumento de miofibroblastos no grupo IMU-COLV 120 dias, sugerindo a participação dessas células no remodelamento cutâneo nesse modelo e mais, que essas células são responsáveis pela síntese de grandes quantidades de colágeno fibrilar dos tipos I e III no processo de fibrose na ES (100).

Quanto ao Col V, ele representa apenas 3 a 5% do colágeno total no tecido cutâneo normal e pode ocorrer em diferentes isoformas. Na pele, a isoforma homotrímica do Col V, formada por três cadeias de $\alpha 1(V)$, forma microfibrilas que se ligam a grandes fibrilas de colágeno I e desempenham o papel de ponte entre a junção da interface dermoepidérmica. Já a isoforma heterotrímica, composta por duas cadeias $\alpha 1(V)$ e uma cadeia $\alpha 2(V)$, é encontrada no interior das fibrilas mistas de Col I e III e tem a função de regular o diâmetro dessas fibrilas heterotípicas (100).

Um dado interessante do estudo refere-se à expressão aumentada do Col V no grupo IMU-COLV 45 dias, que representaria uma fase mais inicial da fibrose na pele dos animais (54,100). Já no grupo IMU-COLV 120 dias, esse aumento de Col V se mantém e obedece a um padrão fibrilar fino, além de intensa interação com as fibras de colágeno I, desenvolvendo uma densa malha fibrilar na derme papilar, essa interação poderia interferir na formação da matriz fibrilar da pele e na sua função. Esses resultados corroboram com estudos anteriores do nosso grupo, que demonstraram que as fibras de Col I e Col V interagem com os fibroblastos dérmicos de pacientes com ES, seguindo um padrão espessado e organizado em agregados irregulares, como observado no modelo IMU-COLV (54). Ainda, nesse estudo, principalmente nos estágios mais iniciais da doença, a pele dos pacientes apresentava aumento da síntese do Col V e distorção do seu padrão fibrilar e esse fato teve relação com a atividade da ES (54). Além disso, de Morais e col., em 2022 sugeriram que a distribuição irregular da isoforma homotrímica do Col V [$\alpha 1(V)_3$] pode ter um papel fundamental na alteração biomecânica da pele, contribuindo para a rigidez e espessamento da

pele na fibrose cutânea precoce relacionada à ES, juntamente com a isoforma heterotrímica do Col V [$\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)_1$].

Em relação à expressão dos genes que codificam as cadeias dos colágenos fibrilares, não houve diferenças estatística na expressão dos genes *Col1a1* e *Col3a1*, respectivamente, das cadeias $\alpha 1$ do Col I e Col III, entre os grupos. Em contraste, o gene *Col5a1* da cadeia $\alpha 1$ do Col V apresentou uma expressão significativa na pele dos animais IMU-COLV 15 dias, em relação ao controle. Ainda, o gene *Col5a2* para a cadeia $\alpha 2$ do Col V também apresentou uma expressão significativa na pele dos animais IMU-COLV 15 dias, em relação ao controle. Esses dados sugerem a participação das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do Col V no desenvolvimento da fibrose cutânea. Corroborando esses dados, estudos anteriores também demonstraram que a expressão dos genes COL5A1 e COL5A2, responsáveis pelas cadeias de Col V, estava elevada na pele de pacientes com ES precoce (54).

O aumento da expressão do gene COL5A2 também foi observado em pacientes com doença pulmonar intersticial relacionada ao estágio avançado da ES, indicando que essa proteína pode desempenhar um papel importante no tecido pulmonar em pacientes com ES (64). O gene COL5A2 também apresenta aumento em outras doenças, como o câncer gástrico. Estudos recentes identificaram alta expressão de COL5A2 em cânceres gástricos associados ao estágio avançado de tumor, nódulo e metástases. Ainda, foi sugerido que o COL5A2 regule processos relacionados com a disfunção da MEC, podendo ativar o desenvolvimento do tumor (101).

Em relação à ativação endotelial e apoptose celular, observamos, além do aumento da positividade para VEGF e caspase-3 no endotélio e na derme, também o aumento significativo de Col V na pele dos camundongos do grupo IMU-COLV 45 dias, sugerindo que esse fato possa estar relacionado a mais uma das funções do Col V, como a capacidade de promover apoptose celular endotelial, via ativação da caspase-3 (102). Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a imunização com Col V em camundongos C57BL/6 induziu apoptose endotelial nos vasos do pulmão (69). Ainda, foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão do Col V e a apoptose celular endotelial nos pulmões de pacientes com ES (63). Considerando esses achados, mais uma

vez, a hipótese de que os fibroblastos e o endotélio podem ser ativados por proteínas da matriz é sugerida pelo fato de que, embora o processo inflamatório na pele esclerodérmica não seja intenso, há um consenso sobre a participação das proteínas da matriz nas vias de sinalização celular na ES (103,104).

Ainda, a positividade para VEGF no modelo IMU-COLV é de grande relevância, já que o VEGF é considerado um mediador de vasculopatia na ES. Estudos em camundongos transgênicos, que desenvolvem fibrose cutânea espontaneamente, têm expressão aumentada de VEGF e apresentam intensa formação de fibrose (105).

Por outro lado, também observamos nos grupos IMU-COLV 45 e 120 dias, aumento significativo do Col I e III e da α -AML. Esses resultados reforçam a ideia do papel da ativação endotelial no modelo IMU-COLV. É estabelecido que um aspecto importante no estudo da patogênese da ES são as características vasculares, não só porque estão quase sempre presentes, mas também porque são indicativos para suspeita do diagnóstico no curso inicial da doença, podendo preceder outras manifestações como a fibrose (76,79,106).

Para esclarecer o mecanismo que resulta na formação fibrilar alterada e fibrose na ES, avaliamos um modelo “*in vitro*” utilizando fibroblastos cutâneos, provenientes do grupo IMU-COLV 120 dias, que nos resultados teciduais apresentaram o perfil fibrilar mais alterado.

Sabe-se que fibroblastos são células importantes no processo de produção dos componentes da MEC. Além disso, respondem a sinais químicos, que ativam a proliferação e diferenciação celular, principalmente a diferenciação em miofibroblastos. Essas células são responsáveis pela deposição excessiva de colágeno durante o processo de cicatrização. Porém, em várias doenças, como a ES, ocorre o aumento na proliferação de fibroblastos e diferenciação em miofibroblastos (17,20). Com isso, em nosso estudo, avaliamos a expressão de vimentina para fibroblastos e α -AML para miofibroblastos, consideradas proteínas que identificam esses fenótipos celulares.

Em relação à expressão de vimentina, não houve diferença significativa nos tempos estudados, ao contrário da expressão de α -AML, onde obtivemos um aumento significativo no grupo IMU-COLV 120 dias, em relação aos demais tempos. Esse dado sugere que os fibroblastos provenientes da pele dos animais

do grupo IMU-COLV 120 dias apresentaram intenso processo de diferenciação celular para miofibroblastos, hipótese justificada pela significativa positividade para α -AML, característica importante presente na ES (106).

Ainda, esses resultados justificam a intensa expressão dos colágenos fibrilares, identificados na derme do modelo IMU-COLV nos períodos estudados, sendo essas células responsáveis por sintetizarem grandes quantidades de colágeno fibrilar do tipo I e III no processo de fibrose na ES (100).

Além disso, observamos que na pele dos animais dos grupos IMU-COLV, 45 e 120 dias, o Col V apresentou um padrão fibrilar fino e intensa interação com as fibras de Col I, desenvolvendo uma densa malha fibrilar na derme, sugerindo uma alteração específica na fibrilogênese do Col V. Ainda, o Col V como já descrito, pode ocorrer em diferentes isoformas e alterações no padrão normal de expressão dessa proteína, pode gerar mudanças na biomecânica do tecido cutâneo (100).

Quando analisado “*in vitro*” a produção do Col V em fibroblastos dérmicos do grupo IMU-COLV 120 dias, foi confirmado o aumento da expressão dessa proteína. Este resultado foi semelhante ao observado quando os fibroblastos normais de camundongo foram estimulados com o Col V. Vale ressaltar, que nos ensaios *in vitro*, verificou-se que o estímulo com Col V é dose dependente, ou seja, fibroblastos estimulados com menores concentrações de Col V apresentam uma produção maior de Col I e de α -AML, e sem alteração fibrilar do Col III e V. Por outro lado, o estímulo com concentrações mais altas de Col V resultou em maior produção de Col III e Col V, caracterizando uma estrutura fibrilar agregada que sugere uma fibrilogênese alterada, possivelmente devido à copolimerização entre as fibrilas de Col V e agregação com fibras de outros tipos de colágeno.

Esses achados corroboram com um estudo anterior do nosso grupo, onde avaliamos “*in vitro*” a reconstrução tridimensional de Col I, Col III e Col V em fibroblastos dérmicos de pacientes com ES. Nesse estudo, as fibras do Col V foram espessadas, distorcidas e organizadas em agregados densos, quando comparados ao controle normal (54).

Além disso, outros estudos indicaram que a derme papilar humana normal apresenta um aumento de Col V, especialmente na presença de células indiferenciadas que produzem uma quantidade significativa deste colágeno. Este

fenômeno forma um nicho onde o próprio Col V mantém essas células nesse estado indiferenciado. Em contraste, na derme reticular, há um número menor dessas células e uma quantidade reduzida de Col V, com predominância de Col I formando fibrilas espessas. Essas diferenças destacam a importância do Col V no processo de diferenciação celular (107).

Em nosso estudo, os fibroblastos saudáveis estimulados com uma concentração de 100 µg de Col V expressaram uma quantidade menor de α -AML, resultando proporcionalmente em uma síntese menor de Col I em relação ao Col III e V. Esse fato pode estar relacionado com a conformação fibrilar anômala que observamos no estudo "in vitro". Sabendo que o Col V regula o diâmetro da fibrila, sugerimos que sua estrutura molecular se modifica, possivelmente pela ativação do gene *Col5a2*.

Ainda, quando avaliamos a reatividade a componentes intracelulares por imunofluorescência em células HEp-2, observamos o desenvolvimento de resposta imunológica com 100% de positividade para presença de fatores antinucleares nos soros obtidos em 30, 45 e 120 dias.

Nesta fase do modelo, há um aumento da autoimunidade para o Col V e seus peptídeos. Recentemente, um estudo do nosso grupo revelou alta prevalência de autoimunidade contra a cadeia $\alpha 1(V)$ na ES nos estágios iniciais da doença, além de uma reatividade imunológica significativa contra os peptídeos Col5A1 (1.049) e Col5A1 (1.439) da cadeia $\alpha 1(V)$ no soro desses pacientes. Isso sugere uma possível associação desses peptídeos com a autoimunidade contra Col V na ES (108). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a autoimunidade contra Col V é predominantemente direcionada para a cadeia $\alpha 1(V)$ (61,62,109,110).

Esses achados "in vivo" e "in vitro" sugerem que Col V participa dos processos celulares anômalos encontrados na ES, possivelmente interferindo na síntese e na sinalização celular de fibroblastos dérmicos, devido a mudanças na sua conformação molecular e a ativação gênica.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os achados desse estudo mostraram que o modelo IMU-COLV desenvolve uma fibrose na pele após 45 dias de imunização constituída de Col I, III e grandes quantidades de Col V. Esse estudo sugere que essa alteração na proporção fibrilar pode ser resultante não só dos mecanismos de ativação das proteínas da matriz, como o Col V, mas também pela reatividade imunológica levando a diferenciação dos fibroblastos e conseqüentemente alterando a produção de colágeno, que é a principal característica da ES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morais J, Martin P, Velosa A, Andrade P, Cruz I, Miracca E, et al. Influence of alpha2 of the collagen V overexpression in physiopathology of fibrosis in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(2):66–7.
2. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *The Lancet*. 2017;390(10103):1685–99.
3. Orlandi M, Barsotti S, Lepri G, Codullo V, di Battista M, Guiducci S, et al. One year in review 2018: Systemic sclerosis. *Clin Dermatol*. 2018;36(4):459–74.
4. Zimmermann AF, Pizzichini MMM. Update on etiopathogenesis of systemic sclerosis. *Rev Bras Reumatol*. 2013;53(6):516–24.
5. Desbois AC, Cacoub P. Systemic sclerosis: An update in 2016. *Autoimmun Rev*. 2016;15(5):417–26.
6. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1(1):1–21.
7. Roofeh D, Khanna D. Management of Systemic Sclerosis: The First Five Years. *Curr Opin Rheumatol*. 2020;32(3):228.
8. Bukiri H, Volkman ER. Current advances in the treatment of systemic sclerosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2022;64.
9. Truchetet ME, Brembilla NC, Chizzolini C. Current Concepts on the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2023;64(3):262.
10. De Pieri A, Korman BD, Jünger A, Wuertz-Kozak K. Engineering Advanced In Vitro Models of Systemic Sclerosis for Drug Discovery and Development. *Adv Biol*. 2021;5(4).
11. Allanore Y. Physiopathologie de la sclérodermie systémique. *médecine/sciences*. 2016;32(2):183–91.

12. Michaelis T, Andretta M, Albers C, Skare TL, Ribas CAPM, Moreira LB. Evaluation of the capillaroscopy using endothelin-1 as a marker of endothelial activation in microvascular injury and cutaneous ulcerations. *Rev Col Bras Cir.* 2012;39(2):126–32.
13. Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2010;37:26–41.
14. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech.* 2011;4(2):165–78.
15. Huang C, Ogawa R. Fibroproliferative disorders and their mechanobiology. *Connect Tissue Res.* 2012;53(3):187–96.
16. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience.* 2004;9:283–9.
17. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014;5:123.
18. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 2.
19. Ebmeier S, Horsley V. Origin of fibrosing cells in systemic sclerosis. Vol. 27, *Current Opinion in Rheumatology.* Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 555–62.
20. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Vol. 13, *Wound Repair and Regeneration.* 2005. p. 7–12.
21. Varga J, Whitfield ML. Transforming growth factor-beta in systemic sclerosis (scleroderma). *Frontiers in Bioscience - Scholar.* 2009;1 S(1):226–35.
22. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor- β and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology.* 2007(13)3056–62.

23. Dufour AM, Alvarez M, Russo B, Chizzolini C. Interleukin-6 and Type-I collagen production by systemic sclerosis fibroblasts are differentially regulated by interleukin-17A in the presence of transforming growth factor-beta 1. *Front Immunol.*2018;9.
24. Sargent JL, Milano A, Bhattacharyya S, Varga J, Connolly MK, Chang HY, et al. A TGFbeta-responsive gene signature is associated with a subset of diffuse scleroderma with increased disease severity. *J Invest Dermatol.*2010;130(3):694–705.
25. Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2010;37(1):11–25.
26. Gerber EE, Gallo EM, Fontana SC, Davis EC, Wigley FM, Huso DL, et al. Integrin-modulating therapy prevents fibrosis and autoimmunity in mouse models of scleroderma. *Nature.*2013;503(7474):126–30.
27. Aloise AC, Pereira MD, Duailibi SE, Gragnani A, Ferreira LM. TGF- β 1 on induced osteogenic differentiation of human dermal fibroblast. *Acta Cir Bras.* 2014;29 Suppl 1:1–6.
28. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.*2016;97:4–27.
29. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*2011;3(1):a004978–a004978.
30. Szász C, Pap D, Szebeni B, Bokrossy P, Órfi L, Szabó AJ, et al. Optimization of Sirius Red-Based Microplate Assay to Investigate Collagen Production In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences.*2023;24(24):17435.
31. Nguyen A v., Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *International Journal of Molecular Sciences.*2019;20(8):1811.
32. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.*2003;55(12):1531–46.

33. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. Guanabara Koogan. Vol. 11. Rio de Janeiro; 2011. 102–123.
34. Chanut-Delalande H, Bonod-Bidaud C, Cogne S, Malbouyres M, Ramirez F, Fichard A, et al. Development of a Functional Skin Matrix Requires Deposition of Collagen V Heterotrimers. *Mol Cell Biol.*2004;24(13):6049–57.
35. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: Interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci.* 1990;95(4):649–57.
36. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis.2019.
37. Miller EJ, Kent Rhodes R. Preparation and Characterization of the Different Types of Collagen. *Methods Enzymol.*1982;82(C):33–64.
38. Niyibizi C, Fietzek PP, van der RM. Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an alpha 1(V) alpha 2(V) alpha 3(V) collagen molecule. *JBiolChem.* 1984;259(22):14170–4.
39. Bonod-Bidaud C, Roulet M, Hansen U, Elsheikh A, Malbouyres M, Ricard-Blum S, et al. In vivo evidence for a bridging role of a collagen V subtype at the epidermis-dermis interface. *Journal of Investigative Dermatology.* 2012;132(7):1841–9.
40. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.*2001;32(3):223–37.
41. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(5–24):495.
42. Musiime M, Chang J, Hansen U, Kadler KE, Zeltz C, Gullberg D, et al. Collagen Assembly at the Cell Surface: Dogmas Revisited. *Cells.*2021;10(3):662.

43. Ruggiero F, Champlaud MF, Garrone R, Aumailley M. Interactions between cells and collagen V molecules or single chains involve distinct mechanisms. *Exp Cell Res.* 1994;210(2):215–23.
44. Ruggiero F, Comte J, Cabañas C, Garrone R. Structural requirements for alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin mediated cell adhesion to collagen V. *J Cell Sci.*1996;109(7):1865–74.
45. Yaoi Y, Hashimoto K, Koitabashi H, Takahara K, Ito M, Kato I. Primary structure of the heparin-binding site of type V collagen. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1035(2):139–45.
46. Delacoux F, Fichard A, Geourjon C, Garrone R, Ruggiero F. Molecular features of the collagen V heparin binding site. *J Biol Chem [Internet].*1998;273(24):15069–76.
47. Mares DC, Heidler KM, Smith GN, Cummings OW, Harris ER, Foresman B, et al. Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.*2000;23(1):62–70.
48. Yoshida S, Haque A, Mizobuchi T, Iwata T, Chiyo M, Webb TJ, et al. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed lung transplants. *Am J Transplant.*2006;6(4):724–35.
49. Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, Smith GN, Cummings OW, Foresman BH, et al. Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection. *Am J Respir Cell Mol Biol.*2001;25(1):26–34.
50. Sumpter TL, Wilkes DS. Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*2004;286(6):L1129-39.
51. Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zheng Y, et al. Evidence for Immune Responses to a Self-Antigen in Lung Transplantation: Role of Type V Collagen-Specific T Cells in the

- Pathogenesis of Lung Allograft Rejection. *The Journal of Immunology*.2002;169(3):1542–9.
52. Braun RK, Molitor-Dart M, Wigfield C, Xiang Z, Fain SB, Jankowska-Gan E, et al. Transfer of tolerance to collagen type V suppresses T-helper-cell-17 lymphocyte-mediated acute lung transplant rejection. *Transplantation*.2009;88(12):1341–8.
 53. Martin P, Teodoro WR, Velosa APP, de Morais J, Carrasco S, Christmann RB, et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*.2012;11(11):827–35.
 54. Lott JM, Sehra S, Mehrotra P, Mickler EA, Fisher AJ, Zhang W, et al. Type V collagen-induced tolerance prevents airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*.2013;187(4):454–7.
 55. Dart ML, Jankowska-Gan E, Huang G, Roenneburg DA, Keller MR, Torrealba JR, et al. Interleukin-17-dependent autoimmunity to collagen type V in atherosclerosis. *Circ Res*. 2010;107(9):1106–16.
 56. Vittal R, Mickler EA, Fisher AJ, Zhang C, Rothhaar K, Gu H, et al. Type V Collagen Induced Tolerance Suppresses Collagen Deposition, TGF- β and Associated Transcripts in Pulmonary Fibrosis. Eickelberg O, organizador. *PLoS One*.2013;8(10):e76451.
 57. Wilkes DS, Chew T, Flaherty KR, Frye S, Gibson KF, Kaminski N, et al. Oral immunotherapy with type V collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*.2015;45(5):1393–402.
 58. Park AC, Huang G, Jankowska-Gan E, Massoudi D, Kernien JF, Vignali DA, et al. Mucosal Administration of Collagen V Ameliorates the Atherosclerotic Plaque Burden by Inducing Interleukin 35-dependent Tolerance. *J Biol Chem*.2016;291(7):3359–70.
 59. Burlingham W, Wilkes DS, Sullivan JA. Why is the patient out of breath? Collagen V(α 1) and K- α 1-tubulin take center stage in lung transplantation. *Am J Transplant*.2014;14(10):2201–3.

60. Tiriveedhi V, Angaswamy N, Brand D, Weber J, Gelman AG, Hachem R, et al. A shift in the collagen V antigenic epitope leads to T helper phenotype switch and immune response to self-antigen leading to chronic lung allograft rejection. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(1):158–68.
61. Keller MR, Haynes LD, Jankowska-Gan E, Sullivan JA, Agashe V V, Burlingham SR, et al. Epitope Analysis of the Collagen Type V-Specific T Cell Response in Lung Transplantation Reveals an HLA-DRB1*15 Bias in Both Recipient and Donor. Kanellopoulos-Langevin C, organizador. *PLoS One.*2013;8(11):e79601.
62. Parra ER, Aguiar AC, Teodoro WR, De Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clinical Respiratory Journal.*2009;3(3):135–42.
63. ER P, WR T, J de M, ML K, R de S, NH Y, et al. Increased mRNA expression of collagen V gene in pulmonary fibrosis of systemic sclerosis. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(2):110–20.
64. Jo H, Brito S, Kwak BM, Park S, Lee MG, Bin BH. Applications of Mesenchymal Stem Cells in Skin Regeneration and Rejuvenation. *Int J Mol Sci.*2021;22(5):1–18.
65. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal Model of Sclerotic Skin. I: Local Injections of Bleomycin Induce Sclerotic Skin Mimicking Scleroderma. *Journal of Investigative Dermatology.* 1999;112(4):456–62.
66. Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol.*2009;182(9):5855–64.
67. Meng M, Tan J, Chen W, Du Q, Xie B, Wang N, et al. The Fibrosis and Immunological Features of Hypochlorous Acid Induced Mouse Model of Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10.
68. Asano Y, Sato S. Animal models of scleroderma: Current state and recent development. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15(12).

69. Thoreau B, Chaigne B, Renaud A, Mouthon L. Pathophysiology of systemic sclerosis. *Presse Medicale*.2021;50(1).
70. Artlett CM. Animal models of systemic sclerosis: Their utility and limitations. *Open Access Rheumatol*. 2014;6:65–81.
71. Asano Y, Beyer C, Schett G, Distler O, Yamamoto T, Marangoni RG, et al. Animal models of scleroderma: Current state and recent development. *Curr Rheumatol Rep*. 2016;15(12):65–81.
72. Mandujano A, Golubov M. Animal Models of Systemic Sclerosis: Using Nailfold Capillaroscopy as a Potential Tool to Evaluate Microcirculation and Microangiopathy: A Narrative Review. *Life* 2022, Vol 12, Page 703. 8 de maio de 2022;12(5):703.
73. Marangoni RG, Varga J, Tourtellotte WG. Animal models of scleroderma: Recent progress. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(6):561–70.
74. Maurer B, Distler JHW, Distler O. The Fra-2 transgenic mouse model of systemic sclerosis. *Vascul Pharmacol*.2013;58(3):194–201.
75. Teodoro WR, Witzel SS, Velosa APP, Shimokomaki M, Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Increase of interstitial collagen in the mouse endometrium during decidualization. *Connect Tissue Res*. 2003;44(2):96–103.
76. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, et al. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract*.2004;200(10):681–91.
77. Bezerra MC, Teodoro WR, De Oliveira CC, Velosa APP, Ogido LTI, Gauditano G, et al. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen. *Arch Dermatol Res*. 2006;298(2):51–7.
78. Callado MRM, Viana VST, Vendramini MBG, Leon EP, Bueno C, Velosa APP, et al. Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology*.2007;122(1):38–46.

79. Teodoro WR, de Jesus Queiroz ZA, dos Santos LA, Catanozi S, dos Santos Filho A, Bueno C, et al. Proposition of a novel animal model of systemic sclerosis induced by type V collagen in C57BL/6 mice that reproduces fibrosis, vasculopathy and autoimmunity. *Arthritis Res Ther.*2019;21(1):278.
80. Yoshinari NH, Teodoro WR, Ogido LTI, Velosa APP, Prizon CC, Miron B, et al. Modelo experimental de doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) induzido por colágeno do tipo V. *Rev bras reumatol.* 2002;295–305.
81. de Oliveira CC, Velosa APP, Parra ER, Capelozzi VL, Teodoro WR, Yoshinari NH. Histomorphometric analysis of cutaneous remodeling in the early stage of the scleroderma model. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(6):577–83.
82. Stawski L, Han R, Bujor AM, Trojanowska M. Angiotensin II induces skin fibrosis: a novel mouse model of dermal fibrosis. *Arthritis Res Ther.*2012;14(4):1–12.
83. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum.*2011;63(11):3575–85.
84. Ruzek MC, Jha S, Ledbetter S, Richards SM, Garman RD. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. *Arthritis Rheum.*2004;50(4):1319–31.
85. Chatterjee S, Mark M, Wooley P, Lawrence W, Mark ME, Wooley PH. Increased dermal elastic fibers in the tight skin mouse. BRIEFPAPER *Clinical and Experimental Rheumatology.* 2004;22:617–20.
86. Christner PJ, Peters J, Hawkins D, Siracusa LD, Jiménez SA. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum.* 1995;38(12):1791–8.

87. Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujiu K, Manabe I, et al. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun.* 2014;5:5797.
88. Maurer B, Distler JHW, Distler O. The Fra-2 transgenic mouse model of systemic sclerosis. *Vascul Pharmacol.*2013;58(3):194–201.
89. Castello-Cros R, Whitaker-Menezes D, Molchansky A, Purkins G, Soslowsky LJ, Beason DP, et al. Scleroderma-like properties of skin from caveolin-1-deficient mice: implications for new treatment strategies in patients with fibrosis and systemic sclerosis. *Cell Cycle.*2011;10(13):2140–50.
90. Manetti M, Rosa I, Milia AF, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, et al. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: A new model of experimental scleroderma? *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1700–9.
91. Velosa APP, Teodoro WR, de Oliveira CC, dos Santos Filho A, Moutinho RF, Santos AG, et al. Collagen V nasal tolerance in experimental model of systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res.*2007;299(4):177–89.
92. Souza R, Teodoro W, Carrasco S, Kairalla R, Borges C, Goldenstain-Schainberg C, et al. Abnormal collagen type V deposition in lung fibroblast is correlated with a worse pulmonary function in systemic sclerosis. *European Respiratory Journal.* 2007;30(1):66–66.
93. Liu T, Zhang J. Expression and distribution of type I, III and V collagens in skin lesions from patients with systemic sclerosis. *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition).*2008;39(5):748–52.
94. Velosa APP, Teodoro WR, dos Anjos DM, Konno R, Oliveira CC, Katayama MLH, et al. Collagen V-induced nasal tolerance downregulates pulmonary collagen mRNA gene and TGF-beta expression in experimental systemic sclerosis. *Respir Res.*2010;11(1):1.

95. Linsenmayer TF, Gibney E, Toole BP, Gross J. Cellular adhesion to collagen. *Exp Cell Res.* 1978;116(2):470–4.
96. Błyszczuk P, Kozlova A, Guo Z, Kania G, Distler O. Experimental Mouse Model of Bleomycin-Induced Skin Fibrosis. *Curr Protoc Immunol.*2019;126(1):e88.
97. Chan EKL, Von Mühlen CA, Fritzler MJ, Damoiseaux J, Infantino M, Klotz W, et al. The International Consensus on ANA Patterns (ICAP) in 2021- The 6th Workshop and Current Perspectives. *J Appl Lab Med.*2022;7(1):322–30.
98. Truchetet ME, Brembilla NC, Chizzolini C. Current Concepts on the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.*2023;64(3):262.
99. Trinh-Minh T, Györfi AH, Tomcik M, Tran-Manh C, Zhou X, Dickel N, et al. Anti-S100A4 monoclonal antibody treatment ameliorates experimental skin fibrosis and SSc-specific transcriptional signatures in human skin. *Arthritis & Rheumatology.*2023
100. de Morais J, Velosa APP, Andrade PC, Frediani D, Carrasco S, Queiroz ZA de J, et al. Collagen V α 1 Chain Decrease in Papillary Dermis from Early Systemic Sclerosis: A New Proposal in Cutaneous Fibrosis Molecular Structure. *Int J Mol Sci.*2022;23(20).
101. Chen M, Zhu X, Zhang L, Zhao D. COL5A2 is a prognostic-related biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer based on transcriptomics and single-cell RNA sequencing. *BMC Med Genomics.*2023;16(1):1–20.
102. Luparello C, Sirchia R. Type V collagen regulates the expression of apoptotic and stress response genes by breast cancer cells. *J Cell Physiol.*2005;202(2):411–21.
103. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol.*2015;6:127381.

104. Zimmermann AF, Pizzichini MMM. Atualização na etiopatogênese da esclerose sistêmica. *Rev Bras Reumatol.* 2013;53(6):516–24.
105. Di Benedetto P, Ruscitti P, Liakouli V, Cipriani P, Giacomelli R. The Vessels Contribute to Fibrosis in Systemic Sclerosis. *Isr Med Assoc J.* 2019;21:471–4.
106. Postlethwaite AE. Pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol.* 2015;6:127381.
107. Hasebe Y, Hasegawa S, Date Y, Nakata S, Yagami A, Iwata Y, et al. Localization of collagen type 5 in the papillary dermis and its role in maintaining stem cell functions. *J Dermatol Sci.* 2018;89(2):205–7.
108. Velosa APP, Brito L, de Jesus Queiroz ZA, Carrasco S, Tomaz de Miranda J, Farhat C, et al. Identification of Autoimmunity to Peptides of Collagen V α 1 Chain as Newly Biomarkers of Early Stage of Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2021;11.
109. Burlingham W, Wilkes DS, Sullivan JA. Why Is the Patient Out of Breath? Collagen V(α 1) and K- α 1-Tubulin Take Center Stage in Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2014;14(10):2201–3.
110. Park AC, Huang G, Jankowska-Gan E, Massoudi D, Kernien JF, Vignali DA, et al. Mucosal Administration of Collagen V Ameliorates the Atherosclerotic Plaque Burden by Inducing Interleukin 35-dependent Tolerance. *Journal of Biological Chemistry.* 12 de fevereiro de 2016;291(7):3359–70.