

VITÓRIA ELIAS CONTINI

Estudo do desenvolvimento precoce da fibrose pulmonar em modelo experimental de esclerose sistêmica induzido com colágeno V

SÃO PAULO

2024

VITÓRIA ELIAS CONTINI

Estudo do desenvolvimento precoce da fibrose pulmonar em modelo experimental 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

(Versão corrigida. Resolução CoPGr n° 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

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

Contini, Vitória Elias

Estudo do desenvolvimento precoce da fibrose pulmonar em modelo experimental de esclerose sistêmica induzido com colágeno V / Vitória Elias Contini; 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.Fibrose pulmonar 2.Colágeno V 3.Modelo experimental de ES 4.Esclerose sistêmica 5.Pulmão 6.Colágeno 7.Fibrilogênese I.Teodoro, Walcy Paganelli Rosolia, orient.
II.Título

USP/FM/DBD-294/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

*Aos meus pais, minha base, meu tudo,
Lucia e Sergio por todo incentivo,
amor, dedicação e cuidado.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me sustentado até aqui e honrado com êxito essa oportunidade que Ele colocou em minha vida.

Durante esta jornada muitas pessoas participaram e ajudaram todo o desenvolvimento deste trabalho, onde serei eternamente grata.

À minha orientadora, Dra. Walcy Rosolia Teodoro, obrigada por ter confiado em mim. Grande parte da pessoa e profissional que me tornei, devo a você. Obrigada por todos os ensinamentos, pela dedicação, paciência e carinho ao longo desses anos. Obrigada por ser uma amiga e muitas 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.

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.

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.

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 minha grandes companheiras e amigas desta jornada Lizandre, Zelita, Thays e Amanda por toda ajuda, consolo, risadas e ombro amigo nos momentos difíceis. Eu sem dúvida, não teria chegado até aqui sem o apoio de vocês. Muito obrigada, Deus sabia que eu precisaria de cada uma de vocês. De amigas, vocês se tornaram minhas irmãs e, além deste título, vou levar cada uma de vocês para toda a vida.

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

Aos meus amados pais, Lucia e Sergio, 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 amor da minha vida e meu companheiro Willian Barile, 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
Nº 88887.625720/2021-00;

Fundos remanescentes da Sociedade Brasileira de Reumatologia, Nº 2023-16

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo Nº 2018/00415-0

EPÍGRAFE

"Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos, os meus caminhos, diz o Senhor. Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos do que os vossos pensamentos."

Ísaías 55:8-9

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 ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Esclerose Sistêmica – Patogênese.....	2
1.2 Comprometimento Pulmonar na Esclerose Sistêmica	5
1.3 Modelos Experimentais de Esclerose Sistêmica.....	7
1.4 A Matriz Extracelular no Pulmão	11
1.5 Colágeno do Tipo V.....	12
1.6 Justificativa	14
2- OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral do estudo	17
2.2 Objetivos secundários	17
3- MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Protocolo Experimental.....	19
3.2 Obtenção do Pulmão	20
3.3 Análise Morfológica do Pulmão	20
3.4 Imunohistoquímica para α -AML, CD3, CD4, CD8, CD20, Caspase 3, VEGF e Fator VIII.....	21
3.5 Quantificação para Imunohistoquímica	22
3.6 Quantificação de Colágeno pela Dosagem da 4-hidroxprolina	22
3.7 Imunofluorescência para Colágeno dos Tipos I, III, V.....	23
3.8 Quantificação do Conteúdo de Colágeno dos Tipos I, III, V.....	24
3.9 Extração de mRNA do Tecido Pulmonar.....	24
3.10 Avaliação Da Concentração E Grau De Pureza Das Amostras	25
3.11 Transcrição Reversa.....	26
3.12 Análise da Expressão Gênica por RT-qPCR	26
3.13 Análise Estatística	28

4. RESULTADOS	30
4.1 Análise da Evolução do Remodelamento Pulmonar.....	30
4.2 Análise Histomorfométrica de Células Inflamatórias no Tecido Pulmonar	31
4.3 Análise da Reatividade Vascular no Tecido Pulmonar.....	32
4.4 Análise Do Remodelamento Do Interstício No Tecido Pulmonar	34
4.5 Expressão dos genes <i>Coll1a1</i> , <i>Col3a1</i> , <i>Col5a1</i> , <i>Col5a2</i> , <i>Tgf-β</i> , <i>α-Aml</i> , <i>Vimentina</i>	36
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Esquema do Protocolo de Imunização com Colágeno V	20
Figura 2– Painel H&E	31
Figura 3- Imunohistoquímica para CD3+, CD4+, CD8+ e CD20+	32
Figura 4- Imunohistoquímica para Fator VIII+, VEGF+, α -AML+ e Capase 3+	33
Figura 5- Painel Tricrômico de Masson e Picrosirius	34
Figura 6- Imunofluorescência para Colágeno I, III e V no Tecido Pulmonar	36
Figura 7- Expressão Gênica do Tecido Pulmonar	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Modelos Experimentais de Esclerose Sistêmica.....	8
Tabela 2– Tabela de volumes dos reagentes para reação de transcrição reversa.	26
Tabela 3- Oligonucleotídeos.....	27

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Cálculo da concentração de 4-hidroxirolina.....	23
Equação 2- Cálculo $\Delta\Delta CT$	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Adjuvante completo de <i>Freund</i>
AIF	Adjuvante incompleto de <i>Freund</i>
ACA	Anticorpo anticentrômero
α-AML	Alfa actina do músculo liso
ATA	Anti-topoisomerase
ATG5	Proteína de autofagia 5
BSA	Albumina sérica bovina
B2m	Beta-2 microglobulina
cDNA	DNA complementar
CD3+	Linfócitos T CD3+
CD4+	Linfócitos T CD4+
CD8+	Linfócitos T CD8+
CD20+	Linfócitos B
CD34+	Células-tronco hematopoéticas
COOH	Carboxila
Col I	Colágeno tipo I
Col III	Colágeno tipo III
Col IV	Colágeno tipo IV
Col V	Colágeno tipo V
CTGF	Crescimento do tecido conjuntivo
DEPC	Pirocarbonato de Dietil
DP	Desvio padrão
DPI	Doença pulmonar intersticial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
ES	Esclerose sistêmica
ERK1/2	Quinase 1/2 Regulada por Sinal Extracelular
ET-1	Endotelina-1
EUSTAR	European Scleroderma Trials & Research Group
FAN	Fator antinuclear

FLi1	Fator <i>friend leukemia integration 1</i>
FRA-2	Antígeno 2 relacionado com <i>Fos</i>
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
g	Gramma
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HCl	Ácido clorídrico
HOCL	Ácido hipocloroso
Hprt1	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
H&E	Hematoxilina-eosina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
KLF5	Fator <i>Kruppel-Like</i>
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo de histocompatibilidade
NH3	Amônia
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
PBS	Tampão Fosfato-salino
PDGF	Fatos de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PPARγ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
rcf	Força centrífuga relativa
RHOB	Membro da Família Homóloga Ras B
RT-qPCR	Reação de transcrição reversa seguida da reação de polimerização em cadeia, em tempo real
Scl-70	Anti-Topoisomerase-I
Scl-GVHD	Doença Esclerodermatosa do Enxerto Contra o Hospedeiro
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2

Th17	Linfócito T auxiliar do tipo 17
TSK-1	<i>Tight skin</i> tipo 1
TSK-2	<i>Tight skin</i> tipo 2
uPAR	Receptor ativador do plasminogênio tipo uroquinase
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VSMCs	Células musculares lisas vasculares
mg	Miligrama
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

Contini, VE. Estudo do desenvolvimento precoce da fibrose pulmonar em modelo experimental de esclerose sistêmica induzido com colágeno V [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2024.

As manifestações pulmonares desempenham um papel significativo nos índices de morbidade e mortalidade de pacientes com Esclerose Sistêmica (ES). A doença pulmonar intersticial (DPI) é a manifestação pulmonar mais comumente associada à doença, com maior risco de se desenvolver no início do curso da ES. Neste sentido, modelos experimentais que mimetizem estágios iniciais da patogênese da doença pulmonar, associada à ES, são essenciais para avaliar novas estratégias terapêuticas que possam reduzir a progressão da fibrose pulmonar. Estabelecemos um modelo experimental em camundongos C57BL/6 imunizados com colágeno tipo V (Col V), que desenvolveram um padrão histológico de pneumonia intersticial inespecífica nos pulmões, associado ao espessamento das pequenas e médias artérias intrapulmonares. No presente estudo avaliamos a evolução da fibrose pulmonar nas fases iniciais da ES, induzida em camundongos C57BL/6 após a imunização com Col V. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram imunizados com duas doses subcutâneas e dois reforços intramusculares de Col V, emulsificado em adjuvante de Freund, e divididas em grupos: IMU-COLV 15, IMU-COLV 30 e IMU-COLV 45 dias. Os marcadores de células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD20^+$, Fator VIII, VEGF, caspase-3 e α -AML e o colágeno dos tipos I, III e V foram imunomarcados e avaliados por análise de imagem. O conteúdo total de colágeno foi dosado bioquimicamente pela 4-hidroxi-prolina e os genes *Colla1*, *Col3a1*, *Col5a1*, *Col5a2*, α -AML, *TGF- β 1* quantificados por RT-qPCR. A análise temporal do tecido pulmonar, mostrou um importante aumento de linfócitos $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD20^+$, assim como, aumento da expressão de Fator VIII, VEGF e α -AML no grupo IMU-COLV15 dias. Salientamos, no grupo IMU-COLV15 dias, o aumento da expressão de colágeno V, corroborando com o aumento da síntese dos seus genes *Col5a1*, *Col5a2*, o que não ocorreu com os genes *Colla1*, *Col3a1*. Adicionalmente, nos animais do grupo IMU-COLV 30 dias, observamos diminuição do infiltrado inflamatório, que foi substituído pelo aumento da expressão de colágeno do tipo III. Em contraste, no grupo IMU-COLV45 dias, estabelece-se um padrão morfológico, similar a pneumonia intersticial inespecífica, com espessamento das pequenas e médias artérias intrapulmonares. A este padrão agregamos o aumento da expressão de Caspase-3, α -AML e intensa expressão do colágeno I e III, assim como da expressão de seus genes *Colla1* e *Col3a1*. Ainda, os genes para vimentina (Vin), α -AML e *TGF- β 1* apresentaram-se mais expressos neste grupo de animais. Estes dados corroboram com o aumento de colágeno total pela dosagem da 4-hidroxi-prolina no grupo IMU-COLV45 dias. Nossos resultados indicam que o comprometimento pulmonar neste modelo tem início com uma fase inflamatória, aos 15 dias após a primeira imunização, e que este processo evolui após 30 e 45 dias. Ainda, que o remodelamento e a fibrose do tecido pulmonar são estabelecidos aos 30 e 45 dias e esse processo está associado à ativação do TGF β 1 e ao depósito de colágeno total, bem como à expressão do colágeno dos tipos I e V no tecido pulmonar. Notavelmente, após 15 dias da primeira imunização, observamos um aumento da síntese de colágeno do tipo V e dos genes *Col5a1* e *Col5a2*.

Palavras-chave: Fibrose pulmonar. Colágeno V. Modelo experimental de ES. Esclerose sistêmica. Pulmão. Colágeno. Fibrilogênese.

ABSTRACT

Contini, VE. Study of early development of pulmonary fibrosis in an experimental model of systemic sclerosis induced with collagen V [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo”; 2024.

Pulmonary manifestations play a significant role in the morbidity and mortality rates of patients with Systemic Sclerosis (SSc). Interstitial lung disease (ILD) is the most commonly associated pulmonary manifestation of the disease, with a higher risk of developing early in the course of SSc. In this regard, experimental models that elucidate the early stages of the pathogenesis of lung disease associated with SSc are essential for evaluating new therapeutic strategies that may reduce the progression of pulmonary fibrosis. Recently, our group established an experimental model in C57BL/6 mice immunized with type V collagen (Col V), which developed a histological pattern of nonspecific interstitial pneumonia in the lungs, associated with thickening of small and medium-sized intrapulmonary arteries. In the present study, we evaluated the evolution of pulmonary fibrosis in the early stages of SSc induced in C57BL/6 mice following immunization with Col V. Female C57BL/6 mice were immunized with two subcutaneous doses and two intramuscular boosts of Col V emulsified in Freund's adjuvant, and divided into groups: IMU-COLV 15, IMU-COLV 30, and IMU-COLV 45 days. CD3+, CD4+, CD8+, and CD20+ cell markers, Factor VIII, VEGF, caspase-3, and α -AML, as well as collagen types I, III, and V, were immunostained and evaluated by image analysis. Total collagen content was biochemically assayed by 4-hydroxyproline, and *Col1a1*, *Col3a1*, *Col5a1*, *Col5a2*, *α -Aml*, and *TGF- β 1* genes were quantified by RT-qPCR. Temporal analysis of lung tissue showed a significant increase in CD3+, CD4+, CD8+, and CD20+ lymphocytes, as well as increased expression of Factor VIII, VEGF, and α -AML in the IMU-COLV15 days group. We emphasize in the IMU-COLV15 days group the increased expression of collagen V, corroborating with increased synthesis of its genes *Col5a1* and *Col5a2*, which did not occur with *Col1a1* and *Col3a1* genes. Additionally, in animals from the IMU-COLV 30 days group, we observed a decrease in inflammatory infiltrate, which was replaced by increased expression of type III collagen. In contrast, the IMU-COLV45 days group established a morphological pattern similar to nonspecific interstitial pneumonia, with thickening of small and medium-sized intrapulmonary arteries. To this pattern, we added increased expression of Caspase-3, α -AML, and intense expression of collagen I and III, as well as expression of their genes *Col1a1* and *Col3a1*. Furthermore, genes for *vimentin (Vin)*, *α -Aml*, and *TGF- β 1* were more expressed in this group of animals. These data corroborate with the increase in total collagen by 4-hydroxyproline assay in the IMU-COLV45 days group. Our results indicate that pulmonary involvement in this model begins with an inflammatory phase 15 days after the first immunization, and this process evolves after 30 and 45 days. Moreover, lung tissue remodeling and fibrosis are established at 30 and 45 days, associated with activation of *TGF- β 1* and deposition of total collagen, as well as expression of collagen types I and V in lung tissue. Notably, after 15 days of the first immunization, we observed an increase in synthesis of collagen type V and genes *Col5a1* and *Col5a2*. This increase persists during fibrosis progression, suggesting that the synthesis of this protein may play a significant role in activating mechanisms involved in fibrosis progression in this experimental model.

Keywords: Pulmonary fibrosis. Collagen V. Experimental model of SSc. Systemic sclerosis. Lung. Collagen. Fibrillogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A Esclerose Sistêmica (ES) é um distúrbio caracterizado pelo envolvimento de pequenas artérias, microvasos e tecido conjuntivo, com deposição de tecido fibrótico e microvascular na pele e em órgãos internos. A ES é cerca de quatro a cinco vezes mais comum entre as mulheres do que homens, têm uma distribuição universal e não apresenta predileção por etnia (1) Embora ainda não se conheça a causa da ES, acredita-se que a expressão da doença seja o resultado de uma complexa interação entre a genética do hospedeiro e o meio ambiente.

Um dos principais desafios do estudo da ES é compreender a transição dos eventos precoces para o desenvolvimento da fibrose, como alteração na comunicação entre as células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos, ativação linfocitária, produção de autoanticorpos, inflamação e fibrose do tecido conjuntivo.

A lesão vascular é considerada um dos eventos patogênicos mais precoces da ES, sendo caracterizada pela ativação da célula endotelial e pela alteração do tônus vascular. O endotélio é alvo de uma agressão imune-inflamatória, promovendo ativação de células endoteliais, levando a alterações vasculares e desorganização progressiva da arquitetura do vaso, resultando na diminuição do lúmen vascular, fibrose da pele e órgãos internos, muitas vezes culminando na falência do órgão. Ainda, a lesão vascular promove a liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial (VEGF), citocinas, quimiocinas e produção de mediadores vasoativos, que levam ao aumento da permeabilidade do vaso e quimiotaxia de células inflamatórias (2) O principal mediador vasoativo sintetizado pelas células endoteliais é a endotelina-1 (ET-1), que é um peptídeo, que atua no desenvolvimento e regulação da fisiologia normal, na função respiratória, homeostase cardiovascular e equilíbrio hidroeletrólítico. Além disso, a ET-1 é um mediador patogênico, podendo causar vasoconstrição, hipertrofia vascular, inflamação e fibrose, resultante da proliferação desordenada de fibroblastos e ainda ser responsável pela adesão leucocitária e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (3)

Na ES, a permanência do estímulo imunológico, desencadeia um processo de remodelamento da matriz extracelular (MEC), que ativa os fibroblastos das áreas afetadas a produzirem quantidades elevadas de colágeno, sendo essa uma característica marcante desta enfermidade (2). Os fibroblastos são células responsáveis pela síntese dos componentes da MEC, como colágeno, elastina, fibronectina e glicosaminoglicanos.

Estes são originados de células mesenquimais e apresentam duas formas distintas de ativação: a forma parácrina, que é ativada pelos fatores de crescimento e citocinas produzidas por células inflamatórias e a forma autócrina que é ativada por citocinas produzidas pelos próprios fibroblastos (4).

As complicações pulmonares na ES ocorrem em 50-70% dos casos de pacientes, e é a principal causa de morbidade e mortalidade, em decorrência da fibrose intersticial e da hipertensão pulmonar (5).

A fase inicial do comprometimento pulmonar na ES caracteriza-se pela presença de hiperplasia septal inflamatória, proliferação de fibroblastos ativos, aumento da densidade de capilares CD34+ na microcirculação e aumento da atividade endotelial (6). As alterações estruturais e celulares no tecido pulmonar consistem no desenvolvimento do processo fibrótico das pequenas vias aéreas, caracterizadas pela infiltração de células inflamatórias, espessamento do interstício septal, remodelamento bronquiolar, espessamento das paredes arteriolas e aumento da densidade de capilares na microcirculação e hiperplasia de fibroblastos, levando a um aumento da produção de colágeno (7).

A lesão tecidual resulta na perda de células epiteliais alveolares do tipo I e células endoteliais, perda da integridade da membrana basal da barreira alvéolo-capilar com colapso das estruturas alveolares, a proliferação de células epiteliais alveolares de tipo II e células endoteliais sobre uma MEC irregular, sem restabelecimento de estruturas alveolares normais e proliferação de fibroblastos e miofibroblastos, com aumento de depósito excessivo de MEC, ocorrendo remodelamento e alteração na histoarquitetura tecidual pulmonar (8). Vários autores demonstram que o tratamento da fibrose pulmonar na ES é mais eficaz se iniciado durante os estágios iniciais, ou antes, da instalação da fibrose irreversível. Por esta razão, a identificação de fatores que possam contribuir para o reconhecimento das alterações precoces no tecido pulmonar é de extrema importância para a condução do tratamento nesta doença (6).

1.1 Esclerose Sistêmica – Patogênese

A ES é uma doença crônica e complexa do tecido conjuntivo, caracterizada pela

desregulação imunológica, danos microvasculares, fibrose da pele e órgãos internos. As manifestações clínicas da ES variam de acordo com a evolução da doença e a resposta ao tratamento. De acordo com a extensão do espessamento da pele, a doença é classificada como um dos 2 subtipos: ES cutânea difusa, em que o dano da pele é estendido proximalmente aos cotovelos e/ou joelhos ou para tórax e/ou abdome, em qualquer momento durante o curso da doença, e ES cutânea limitada, em que o dano da pele permanece distal aos cotovelos e joelhos, sem envolvimento de tórax ou abdome. Embora essa distinção clínica tenha se mostrado capaz de prever o aparecimento de complicações graves, incluindo fibrose de pulmão, a classificação baseada na extensão do envolvimento da pele tem várias limitações (6).

A interação entre eventos ambientais e fatores genéticos, como exposições relacionadas ao trabalho com a poeira de sílica, cloreto de vinil e solventes orgânicos ou vírus e outros agentes infecciosos, provavelmente desempenham um papel na origem da doença. (9). Até o momento, ainda existe muita incerteza sobre a patogênese da ES. Não se sabe se o processo de patogênese é iniciado por desequilíbrio do sistema autoimune, distúrbios nas células endoteliais ou disfunção de fibroblastos, bem como se essas três áreas de disfunção estão associadas e como interagem. Presume-se que a vasoconstrição patológica preceda a inflamação autoimune e o processo fibrótico. Por esta razão, todos os anos, muitos estudos contribuem para enriquecer o conhecimento sobre a patogênese, envolvimento de órgãos e tratamento desta doença complexa e grave (10).

Semelhante a outras doenças do tecido conjuntivo, a ES é caracterizada por uma notável predominância feminina, com uma proporção estimada de mulheres e homens de 5-12:1, entre vários coortes (11,12).

A presença de doença pulmonar intersticial (DPI) na ES é uma das principais complicações, devido à sua associação com pior prognóstico. No entanto, o curso da DPI em pacientes com ES é muito heterogênea, possivelmente pela grande variabilidade interindividual. Um estudo recente da EUSTAR mostrou que enquanto 30% dos pacientes com ES-DPI podem apresentar progressão em um período de 12 meses, apenas uma minoria de pacientes teve grande declínio na função pulmonar. (13).

O pulmão é um dos órgãos mais afetados na ES, sendo o acometimento fibrótico pulmonar caracterizado pela vasculopatia, infiltrado inflamatório, liberação de citocinas e por excessiva deposição dos componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno.

O envolvimento vascular é atualmente considerado o elemento patológico inicial da ES e elucidar este mecanismo pode auxiliar na compreensão do estágio inicial da doença. O início da lesão vascular na ES inclui ativação endotelial e dano vascular, espessamento da parede do vaso devido à proliferação de células da íntima e do músculo liso e, finalmente, estreitamento e obliteração do vaso, que levam à isquemia tecidual, estresse oxidativo e, finalmente, disfunção orgânica. Este processo induz a proliferação de células inflamatórias, produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no local, mas são o fator transformador de crescimento beta (TGF- β), endotelina-1 (ET-1) e a cascata Ras-ERK1/2, os principais fatores que contribuem para a fibrose tecidual, por acúmulo de MEC. Entre os marcadores de lesão vascular, destacam-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), endotelina-1 (ET-1), fator de von Willebrand e moléculas de adesão solúveis (ICAM-1 e VCAM-1) (14).

Nos estágios iniciais da doença, observa-se aumento dos níveis do VEGF e ocorrem eventos fibroproliferativos do vaso (15). A vasculopatia no início da ES, pode ser responsável pela resposta imune e pela fibrose que resulta da lesão endotelial, hiperplasia da camada íntima do vaso, infiltrado inflamatório perivascular e diminuição da densidade de capilares (16). As lesões endoteliais levam à perda da proliferação celular e ruptura da membrana basal, ao aumento do número de células endoteliais apoptóticas e diminuição da ação de seus precursores (17).

O infiltrado inflamatório perivascular e a hiperplasia da íntima, responsáveis pelo aumento da espessura da parede vascular, são explicados pelo excesso de proliferação de células relativamente indiferenciadas, que revestem e estabilizam os pequenos vasos sanguíneos e células musculares lisas vasculares (VSMCs) (18).

Os danos causados na angiogênese alterada também são marcantes na vasculopatia da ES. Camundongos transgênicos para VEGF apresentaram diminuição do número de microvasos e fibrose cutânea mais acentuada, em modelo experimental de ES induzido por bleomicina (19).

Vários estudos mostram associação de ET-1 com ou sem sinalização de TGF- β e Ras-ERK1/2 no desenvolvimento de ES, vasculopatia e fibrose da derme, pulmões e vários órgãos. Ainda, demonstram que a ET-1 e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) podem funcionar como cofatores da cascata de TGF- β , desempenhando um importante papel na indução de fibrose. Assim, o TGF- β sozinho ou em combinação com ET-1 e CTGF pode ativar várias proteínas quinases, como a via Ras-

ERK1/2, que serve como fator fundamental para o desenvolvimento da fibrose. A ET-1 é o principal mediador vasoativo sintetizado pelas células endoteliais. É um peptídeo natural, tendo funções no desenvolvimento e regulação da fisiologia normal, desenvolvimento da função respiratória, homeostase cardiovascular e equilíbrio hidroeletrolítico. Além disso, a ET-1 é um mediador patogênico, podendo causar efeitos de vasoconstrição, hipertrofia vascular, inflamação e fibrose causada por proliferação desordenada de fibroblastos (20).

Estudos genéticos identificaram um complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II como principal indicador de suscetibilidade a ES, que também está implicado no aumento da suscetibilidade de outras doenças autoimunes, como esclerose múltipla, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (21). Os principais genes relacionados à ES podem ser classificados em dois grupos de acordo com suas funções, sendo o primeiro grupo os genes envolvidos em mecanismos inflamatórios e imunológicos, apoptose, autofagia e depuração do DNA (PPAR γ , FAS, RHOB e ATG5) e, outro grupo, os genes que promovem fibrose e deposição de matriz extracelular (MEC). Variantes envolvidas na codificação de fibrose podem ser detectadas por sequenciamento completo do exoma, que identifica os genes envolvidos nas vias mediadoras da MEC (*Col5a1*, *Col5a2*, *Col1a1*, *Col3a1*, *Col4a4*) (22).

Já está bem estabelecido que 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 essa a característica marcante desta enfermidade. Esta ativação constante dos fibroblastos é potencializada pela interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF- β , liberados pelos sistemas imunológico e vascular. A fibrose na ES resulta de miofibroblastos cronicamente ativados (23).

Geralmente, no processo de fibrose, três vias desempenham um papel crucial: 1) TGF- β , 2) Wnt/ β -catenina e 3) PPAR γ . Tanto o TGF- β , quanto o Wnt/ β -catenina estimulam um ao outro pela via SMAD, enquanto o PPAR γ , ao ativar o SMAD7, diminui a via SMADS e a sinalização do TGF- β . Por outro lado, o TGF- β estimula a via WNT/ β -catenina e, concomitantemente, diminui a expressão do PPAR γ (24).

1.2 Comprometimento Pulmonar na Esclerose Sistêmica

O envolvimento pulmonar na ES é separado em dois subconjuntos distintos:

hipertensão arterial pulmonar (HAP) e DPI. A HAP afeta cerca de 15 % dos pacientes com ES e é considerada uma complicação importante associada as taxas mais altas de mortalidade, se não for diagnosticada precocemente. A ES cutânea limitada mostrou ter uma maior prevalência de HAP, em relação à ES cutânea difusa (25,26).

O tempo médio entre o diagnóstico de ES e o desenvolvimento de HAP clinicamente caracterizada, normalmente é de 3 a 6 anos e, por esta razão, é considerada uma complicação tardia da ES. Os mecanismos patogênicos da fibrose pulmonar e da HAP são complexos e ainda não completamente compreendidos, mas envolvem interação entre os constituintes celulares do pulmão (27).

A fibrose pulmonar está presente em 80% dos pacientes com ES, mas somente 25-30% desenvolvem a doença pulmonar intersticial progressiva (28). A DPI foi descrita em praticamente todas as doenças do tecido conjuntivo, com maior prevalência em ES, na qual é uma complicação inicial, com muitos pacientes desenvolvendo doença pulmonar restritiva nos primeiros 5 anos do início dos sintomas. Esta complicação geralmente se estabiliza durante os primeiros 4-6 anos após o surgimento da doença (4,29).

Nas últimas décadas, estudos indicaram diferentes vias para serem investigadas no desenvolvimento de DPI na ES, como envolvimento de dano epitelial alveolar, mediado imunologicamente, distúrbios endoteliais e o subsequente e progressivo remodelamento anormal da MEC e formação de miofibroblastos (4).

A DPI decorre com um processo celular infiltrativo que acomete o epitélio alveolar, endotélio capilar pulmonar, membrana e tecidos perivasculares e perilinfáticos. Na ES, a DPI é caracterizada principalmente por alveolite fibrosante. Os pacientes geralmente apresentam um declínio lento da função pulmonar, que em alguns casos progride rapidamente após o início da doença e resulta em fibrose intersticial pulmonar (10).

A etapa inicial do comprometimento pulmonar na ES caracteriza-se pela presença de hiperplasia septal inflamatória, proliferação de fibroblastos ativos, aumento da densidade de capilares CD34+ na microcirculação e aumento da atividade endotelial (30). As alterações estruturais e celulares no tecido pulmonar consistem no desenvolvimento do processo fibrótico das pequenas vias aéreas, caracterizadas pela infiltração de células inflamatórias, espessamento do interstício septal, remodelamento bronquiolar, espessamento das paredes arteriolas, aumento da densidade de capilares na

microcirculação e hiperplasia de fibroblastos, levando a um aumento da produção de colágeno (31).

Quando ocorre a lesão tecidual há uma série de eventos, como a perda de células epiteliais alveolares do tipo I e células endoteliais; perda da integridade da membrana basal da barreira alvéolo-capilar, com colapso das estruturas alveolares; a proliferação de células epiteliais alveolares de tipo II e de células endoteliais sobre uma MEC irregular. Na ausência do restabelecimento de estruturas alveolares normais e com a proliferação de fibroblastos e miofibroblastos exacerbada, o conseqüente aumento de depósito excessivo de MEC, culmina no remodelamento e alteração na histoarquitetura tecidual pulmonar (32,33).

Vários autores demonstram que o tratamento da fibrose pulmonar na ES é mais eficaz se iniciado durante os estágios iniciais, ou seja, antes da instalação da fibrose irreversível. Atualmente, estão sendo identificados muitos fatores que contribuem para o desenvolvimento de alterações precoces no tecido pulmonar e seu reconhecimento é de extrema importância para o tratamento nesta fase da doença (30).

Nas últimas décadas houve grande avanço nas investigações de biomarcadores de pele e pulmão na ES, desde autoanticorpos específicos, aplicação de escores clínicos, técnicas histológicas, identificação de mediadores presentes no sangue periférico e análises de proteomas e transcriptoma (10).

Devido a contribuição de novos modelos experimentais e tecnologias de biologia molecular envolvendo áreas genômicas, epigenética, transcriptômica de amostras desses modelos, houve um avanço significativo no entendimento desses mecanismos que contribuem para a ocorrência de vasculopatia e fibrose.

Modificações pós-traducionais de histonas, hipometilação do DNA e sistemas de microRNA ou RNAs não codificantes foram identificados, como participantes no processo de ativação autoimune e processos fibróticos em pacientes com ES.

1.3 Modelos Experimentais de Esclerose Sistêmica

Como mencionado anteriormente, foi estabelecido que a vasculopatia é atualmente considerada o elemento patológico inicial da ES, e que elucidar seus possíveis mecanismos, culminaria na compreensão do estágio inicial da doença. Entretanto, a dificuldade na obtenção de amostras de tecidos de pacientes e as diversas fases da doença,

levou a utilização de modelos animais, que mimetizam as principais alterações morfológicas da doença e auxiliem no desenvolvimento de terapias mais eficazes na ES (34).

Foram descritos ao longo dos anos mais de 20 modelos experimentais de ES, incluindo 17 modelos genéticos em camundongos e 7 modelos induzidos, que expressam as principais características da doença (35). A tabela 2 mostra as principais alterações encontradas em alguns modelos experimentais de ES.

Tabela 1– Modelos Experimentais de Esclerose Sistêmica.

		Modelos de ES	Fibrose	Vasculopatia	Inflamação	Autoimunidade
Modelos Induzidos		Bleomicina	+	±	+	FAN
		HOCL	+	-	+	ACA, ATA
		Angiotensina II	+	-	+	-
		IMU- COLV	+	+	-	FAN, Anti-Col III, Anti-Col IV
		Induzido por Topo I	+	-	+	ATA
		Scl-GVHD	+	±	+	FAN
Modelos Genéticos	Espontâneos	TSK-1	+	-	-	FAN, ATA, Anti-DNA
		TSK-2	+	-	+	FAN, ATA, ACA, Anti-DNA
	Modificados	Fli1+/- Klf5 +/-	+	+	+	FAN
		Fra-2	+	+	-	-
	Caveolina-1	+	+	±	-	
	uPAR	+	+	-	-	

ACA: autoanticorpos anticentrômero; FAN: autoanticorpos antinucleares; ATA: autoanticorpos antitopoisomerase I; Fli-1: Integração do vírus da leucemia aguda; Camundongos Fli-1 CKO: camundongos nocaute Fli-1 específicos para células endoteliais; Fra-2: antígeno 2 relacionado ao fator de transcrição Fos; Modelo HOCL: exposição ao ácido hipocloroso; KLF5: Fator tipo Krüppel 5; Fli-1+/- KLF5+/-: duplo heterozigoto; Scl-GVHD: Doença Esclerodermatosa do Enxerto Contra o Hospedeiro; Topo I Ab: autoanticorpos anti topoisomerase I; Camundongos TSK: camundongos de pele dura-1; uPAR: Receptor ativador do plasminogênio tipo uroquinase.

Um dos modelos de ES mais utilizados é o induzido pela Bleomicina. A

Bleomicina é um antibiótico composto por um glicopeptídeo isolado do fungo *Streptomyces verticillus*, que atua nas células endoteliais, imunológicas, fibroblastos e queratinócitos; além disso, aumenta a expressão do gene das proteínas da MEC, de citocinas fibrogênicas, que podem contribuir para a indução da fibrose (36). A Bleomicina tem sido utilizada para induzir fibrose pulmonar em roedores, através da administração intratraqueal; ainda, doses diárias por via subcutânea durante 14 dias, podem induzir fibrose pulmonar persistente e não resolutive, predominantemente perivascular, similar ao padrão morfológico das alterações patológicas da doença pulmonar associada à ES (37).

Nos últimos anos, novos modelos animais foram estabelecidos através de injeções subcutâneas com agentes que geram radicais hidroxilas ou ácido hipocloroso (HOCL). Estes agentes induzem fibrose cutânea e pulmonar, além de positividade para o anticorpo anti-Scl-70 (38).

Outro agente indutor de alterações semelhantes à ES é a angiotensina II, que atua na vasoconstrição, gerando inflamação e fibrose. A angiotensina II exógena, aumenta a produção de colágenos tipo I e TGF- β 1 pelos fibroblastos, resultando em fibrose pulmonar similar à ES (39).

Muitos estudos de reatividade imunológica em modelos experimentais mostram que o anticorpo anti-Scl-70 (topoisomerase I) no soro está relacionado com o acometimento da pele, aumento de citocinas inflamatórias e fibrose pulmonar. Por esta razão foi desenvolvido um modelo de ES através da injeção subcutânea quinzenal de topoisomerase I e adjuvante completo de Freund, que promove fibrose dérmica, pulmonar e resposta imune Th2 / Th17 (40).

Também foram desenvolvidos modelos de ES pela mutação no genoma, como ocorre no camundongo *tight skin* tipo 1 (TSK1/+). Os camundongos TSK1/+ são resultantes da mutação do gene da fibrilina-1 no cromossomo 2 (34), que é uma proteína estrutural da MEC e o principal componente das microfibrilas. O TSK/+ apresenta características fibróticas e autoimunes semelhantes a ES, como a sinalização, ativação de células B, acompanhada da produção de auto anticorpos, e ativação de vias moleculares pró-fibróticas. Entretanto, as alterações morfológicas do tecido pulmonar são semelhantes ao enfisema, com processo fibrótico leve e pouca fibrose (41).

Outro modelo de ES é o camundongo *tight skin* tipo 2 (TSK-2/+), induzido pela administração do agente mutagênico *ethylnitrosourea*, que gera uma mutação localizada

no cromossomo 1 e herdada como uma característica autossômica dominante. Os TSK-2/+ desenvolvem fibrose dérmica, depósito de colágeno na pele e autoanticorpos, mas não foi relatada fibrose em outros órgãos (42).

Modelos genéticos também foram descritos mais recentemente, como o fator de integração 1 da leucemia de *Friend 1* (Fli1) e o fator *Kruppel-like 5* (KLF5). O Fli1 é um membro da família do fator de transcrição de Ets (As proteínas Ets compreendem uma família de fatores de transcrição que se ligam ao DNA, através do domínio E *twenty-six*, ou domínio Ets. Todos os genes Ets contém uma região de sequência conservada, formada por 84-90 resíduos de aminoácidos) 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 linhagem endoteliais e hematopoiéticas e participa na regulação do desenvolvimento e diferenciação dessas células. Os camundongos com deficiência heterozigótica de Klf5 e Fli1 (Klf5 +/-, Fli1+/-) aos 3 meses de idade desenvolvem vasculopatia, ativação de células B e produção de auto anticorpos e, mais tardiamente, fibrose pulmonar (43).

Outro modelo é o relacionado ao antígeno Fos (Fra-2), um membro da família Fos-AP1 de reguladores transcricionais. Os camundongos transgênicos Fra-2 desenvolvem fibrose sistêmica com manifestações vasculares semelhantes às da ES, oclusão arterial pulmonar com 12 semanas de idade e posteriormente desenvolvem fibrose pulmonar. A coexistência de oclusão arterial pulmonar com fibrose pulmonar é semelhante ao envolvimento pulmonar de ES. A limitação desse modelo é a ausência da resposta imunológica (44).

O receptor do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPAR) é um componente do sistema fibrinolítico, expresso por células endoteliais, fibroblastos e monócitos, que também desempenha um papel importante na degradação da MEC. A clivagem de uPAR em células endoteliais está associada com anormalidades microvasculares da ES e com a transição de fibroblastos para miofibroblastos. Os camundongos com deleção no gene para uPAR reproduzem características vasculares e fibróticas da ES, mas também não apresentam aspectos imunológicos descritos na doença (45).

A cerca de 20 anos foi estabelecido pelo nosso grupo um modelo experimental de ES desenvolvido em coelhos, da linhagem Nova Zelândia. Estes animais desenvolveram alterações morfológicas, vasculares e imunológicas semelhantes à ES em humanos. A

imunização com Col V resultou em depósito de colágeno na derme superficial e profunda, atrofia dos anexos cutâneos e numa redução do tecido adiposo. As alterações desenvolvidas nestes animais não foram restritas só a pele, também foram caracterizadas fibrose pulmonar, alterações cardíacas, esofágicas e ao redor dos vasos do interstício renal. Ainda, os animais apresentaram imunocomplexos e anticorpos anti-Scl-70 e anticorpos anticolágeno dos tipos I, III e IV no soro (46). As alterações morfológicas foram observadas a partir do sétimo dia da imunização com Col V (7). Animais imunizados com outros tipos de colágeno, mesmo os colágenos que aparecem aumentados na ES em humanos, como o colágeno tipo I (Col I) e o colágeno tipo III (Col III), não desenvolveram nenhum tipo de alteração, 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. Recentemente, este modelo de ES foi transposto para camundongos da linhagem C57BL/6, que apresentam grande susceptibilidade a desenvolver fibrose pulmonar, além de representarem menores custos com a manipulação e a possibilidade de realizar o estudo da reatividade imunoinflamatória, através de Kits específicos para a espécie, o que torna o modelo murino de ES mais atrativo e viável para o estudo da patogênese e de estratégias terapêuticas para esta doença. Os camundongos C57BL/6 imunizados com Col V (IMU-COLV) apresentaram as principais características encontradas na ES humana, incluindo o infiltrado inflamatório e fibrose pulmonar, fibrose cutânea, alterações vasculares decorrentes do aumento da expressão de apoptose de células endoteliais e expressão de Endotelina-1 (ET-1) e VEGF e manifestações imunológicas, com a presença de anti-Col III e anti-Col IV e FAN (Fator anti-nuclear) (47). Assim, este modelo pode ser considerado uma nova opção para o estudo da patogênese e novas estratégias terapêuticas na ES, uma vez que reproduz simultaneamente fibrose, vasculopatia e autoimunidade.

1.4 A Matriz Extracelular no Pulmão

A MEC pulmonar é composta por uma complexa rede de macromoléculas e desempenha um papel essencial na sustentação estrutural do pulmão. Os principais componentes da MEC do tecido pulmonar são as fibras elásticas, o colágeno, proteoglicanos (versicam, decorina, biglicano e lumicam), bem como glicoproteínas (fibronectina e tenascina) e outras.

O colágeno é a proteína mais abundante dos tecidos, por isso desempenha funções,

que são essenciais para a homeostase do tecido pulmonar. Nas vias aéreas, a MEC das rígidas cartilagens, é composta principalmente por colágeno e proteoglicanos, e de tecido intersticial, que sustenta células epiteliais e células musculares lisas. Nas zonas respiratórias e de transição, a MEC apresenta um papel mais dinâmico, adequando as constantes oscilações no volume pulmonar em sua função de inspiração e expiração. A função da MEC do bronquíolo respiratório é prover uma estrutura forte, porém expansiva, que preserve a interface epitélio-capilar presente nos alvéolos pulmonares.

Ainda, os componentes da MEC desempenham um papel importante no reparo e desenvolvimento das funções pulmonares, como na migração e proliferação celular, equilíbrio hídrico, adesão celular e regulação de fatores inflamatórios.

Os fibroblastos pulmonares são essenciais para o processo de reparação tecidual, uma vez que são as células responsáveis pela síntese do colágeno no tecido pulmonar. Além dos fibroblastos, outras células também estão implicadas nos eventos responsáveis pelo remodelamento, como as células epiteliais e os mediadores sintetizados pelas células inflamatórias que desempenham importante papel na ativação da produção descontrolada dos componentes da MEC.

1.5 Colágeno do Tipo V

O Col V pertence ao grupo dos colágenos fibrilares, juntamente com os tipos I, II, III e XI. Este colágeno tem distribuição ubíqua, sendo encontrado na maioria do tecido conjuntivo em menor proporção, em relação aos outros colágenos, com cerca de 2 a 5%. O Col V está localizado principalmente entre a membrana basal e tecido conjuntivo adjacente, em tecidos como o pulmão, pele, baço, córnea, fígado, rim, coração, entre outros (48).

A estrutura bioquímica do Col V compreende um domínio contínuo em tripla hélice helicoidal (domínio helicoidal ou colagenoso) e dois domínios globulares telopeptídeos terminais (NH₃ e COOH) (49). 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 (50,51).

O Col V se copolimeriza com o Col I e Col III, presentes de forma abundante na

pele e no interstício pulmonar, para formar as fibrilas heterotípicas (I/III/V) (BIRK et al., 1990). A região fibrilar do Col V encontrasse embebida no interior das fibrilas heterotípicas, enquanto o domínio globular amino-terminal do Col V se projeta para fora destas fibrilas e impede fisicamente que novos monômeros de Col I se acrescentem à fibrila heterotípica. Deste modo, o domínio globular amino-terminal do Col V confere a função de regular o diâmetro das fibrilas de colágeno heterotípicas. Por conta dessa característica, o Col V tem atividade importante na organização, crescimento e dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas, sendo atualmente considerado o nucleador da fibrilogênese do Col I (50,52–54).

Uma característica peculiar do Col V em relação aos outros colágenos é o fato de possuir propriedades imunogênicas, antigênicas e pelo potencial de tornar-se um autoantígeno, quando exposto pela ação de metaloproteinasas ou outros agentes indutores da lesão endotelial crônica (52). 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 de ES (52,55–60). Ao contrário, a indução de tolerância oral/nasal com o Col V preveniu o desencadeamento destes processos patológicos em modelos experimentais (56,58,59,61,62). Ainda, a imunoterapia oral com Col V se mostrou segura e eficaz na melhora da função pulmonar em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (57).

A presença de Col V estruturalmente anômalo, com fibras mais curtas e espessas com distribuição heterogênea, foi identificada na pele e pulmão de animais do modelo experimental induzido com Col V e de pacientes com ES (7,63,64). Trabalhos recentes realizados no nosso laboratório demonstraram que pacientes com ES apresentam aumento na expressão de Col V, do gene COL5A2 e da cadeia $\alpha 2(V)$ na pele e pulmão, nas fases mais precoces da ES (7,64,65). Ainda, o depósito de Col V anômalo na pele de pacientes com ES, se correlacionou com o espessamento cutâneo e atividade da doença (65). Além disso, foi determinado uma maior frequência de anticorpos anti-Col V em pacientes com ES, no início da doença em relação a estágios mais tardios (66). Recentemente, foi mostrado que a autoimunidade para o Col V na ES nos estágios iniciais é prevalente para a cadeia $\alpha 1(V)$, com maior reatividade para os peptídeos Col5A1 (1.049) e Col5A1(1.439) da cadeia $\alpha 1(V)$, sugerindo que estes peptídeos da cadeia $\alpha 1(V)$ possam estar relacionados com a autoimunidade para o Col V na ES (67).

Estes achados, aliados ao fato de que a tolerância nasal com Col V no modelo experimental de ES, diminui o processo inflamatório e processo fibrótico no pulmão e pele, além de diminuir a expressão de TGF- β , são mais um indício de que o Col V, tenha participação na patogênese da ES, como um neoantígeno desencadeante de resposta autoimune (51,64).

1.6 Justificativa

O acometimento pulmonar, que ocorre em 50-70% dos casos de pacientes com ES, engloba a DPI e HAP, e é a principal causa de morbidade e mortalidade nesta doença (34). Já é bem determinado que as principais alterações celulares na fase inicial de comprometimento pulmonar na ES são: hiperplasia septal inflamatória, proliferação de miofibroblastos, aumento da densidade de capilares CD34+ na microcirculação e aumento da atividade endotelial evidenciado pela expressão aumentada das moléculas de adesão. A lesão vascular é descrita como um dos eventos patogênicos mais precoces e resulta em aumento da permeabilidade dos vasos, influxo de células inflamatórias e produção de citocinas e mediadores vasoativos. A perpetuação do estímulo imunológico inicial promove o remodelamento da matriz extracelular pelo grande depósito de colágeno, porém até o presente momento não está definido o mecanismo fisiopatogênico da fibrose pulmonar durante a evolução da ES.

Considerando que a obtenção de amostras de tecido pulmonar de pacientes com ES, nas diversas fases da doença, torna-se inviável para estudo da fisiopatogênese da doença pulmonar, os modelos experimentais de ES constituem ferramentas essenciais para o estudo da progressão da doença nos aspectos histopatológico e molecular. Neste sentido, recentemente o modelo experimental induzido pela imunização com Col V em camundongos C57BL/6, após 120 dias de doença mostrou um padrão histológico pulmonar com espessamento septal homogêneo, inflamação e fibrose, com a histoarquitetura pulmonar caracterizada por pneumonia intersticial inespecífica, compatível com o padrão encontrado no pulmão de pacientes com ES. Ainda, os animais com 120 dias de doença apresentaram hipertrofia nas artérias intrapulmonares e fibrose da camada adventícia, aliada a um aumento significativo no conteúdo de colágeno e fibrose no parênquima pulmonar, além de alterações na mecânica pulmonar (47).

Estes achados fornecem evidência clara de uma extensa fibrose parenquimatosa e

vascular no pulmão dos camundongos imunizados com Col V, ao qual corresponde a um quadro similar às fases avançadas da doença em humanos (47). Entretanto, até o momento, não foram determinadas as alterações do tecido pulmonar em fases mais precoces no modelo experimental de ES em camundongos C57BL/6. Este estudo é de extrema importância, uma vez que os processos de inflamação e remodelamento pulmonar no início da ES não são passíveis de estudos histopatológicos e moleculares em tecidos de pacientes. Assim, a avaliação temporal do tecido pulmonar neste modelo de ES pode ser de grande valia para o entendimento da fisiopatologia da fibrose pulmonar nas fases iniciais da doença.

OBJETIVO

2- OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral do Estudo

Caracterizar a evolução do processo fibrótico pulmonar em camundongos C57BL/6 após 15, 30 e 45 dias de imunização com Colágeno V (Col V), com ênfase nas fases inflamatória, reparativa e fibrótica.

2.2 Objetivos Secundários

Avaliar a morfologia do tecido pulmonar utilizando as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson e Picrosírius, após a indução da esclerose sistêmica experimental (ES). Analisar a reatividade vascular, incluindo os fatores VEGF e Fator VIII, e a resposta imune (linfócitos T e B) e na expressão dos genes Col5a1 e Col5a2 no pulmão.

Avaliar o perfil das células inflamatórias CD3, CD4, CD8 e CD20 positivas, após 15, 30 e 45 dias de imunização.

Quantificar o colágeno total no tecido pulmonar após 15, 30 e 45 dias da indução da doença

Avaliar a distribuição dos colágenos I, III e V no tecido pulmonar em 15, 30 e 45 dias de imunização Avaliar a expressão de caspase 3, α -actina de músculo liso, e a expressão dos genes Col1a1, Col3a1, Col5a1, Col5a2, Tgf- β , α -Aml e Vimentina após a indução da ES

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolo Experimental

Indução de Esclerose Sistêmica Experimental Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (n=30) foram imunizadas, por via subcutânea, com 150µg de Col V de placenta humana (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA), diluído em 200µl de ácido acético 10mM, pH6,0 e emulsificado em igual volume de adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA). No vigésimo dia após a imunização, os camundongos foram imunizados, por via intramuscular, com uma dose idêntica de Col V e adjuvante incompleto de Freund. Após 15 dias foi realizado mais um reforço, por via intramuscular, com 150µg/200µl de Col V, emulsificado em igual volume de adjuvante incompleto de Freund (**Figura 1**).

Para avaliação das alterações pulmonares em fases iniciais da ES experimental foram estabelecidos os grupos de imunizados com Col V (IM-COLV) por 15 (n=10), 30 (n=10) e 45 (n=10) dias após a primeira imunização. Considerando o protocolo de indução de ES, o grupo de 15 dias foi submetido apenas à primeira imunização, o grupo de 30 dias foi submetido a imunização e um reforço e o grupo de 45 dias recebeu todas as doses (imunização e os dois reforços) de Col V (**Figura 3**). Os animais controles (n=27) foram imunizados apenas com adjuvante completo ou incompleto de Freund, diluído em 200µl de ácido acético 10mM, seguindo o mesmo protocolo e grupos (15, 30 e 45 dias) dos animais imunizados (**Figura 1**).

Para minimizar reações indesejadas, o volume de 200µl 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. (68,69). Uma hora antes do início do experimento, os animais dos grupos IM-COLV de 15, 30 e 45 dias e respectivos controles foram submetidos a analgesia preventiva com cloridrato de tramadol, por via subcutânea (40 mg/Kg de peso corporal).

No momento prévio às 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.

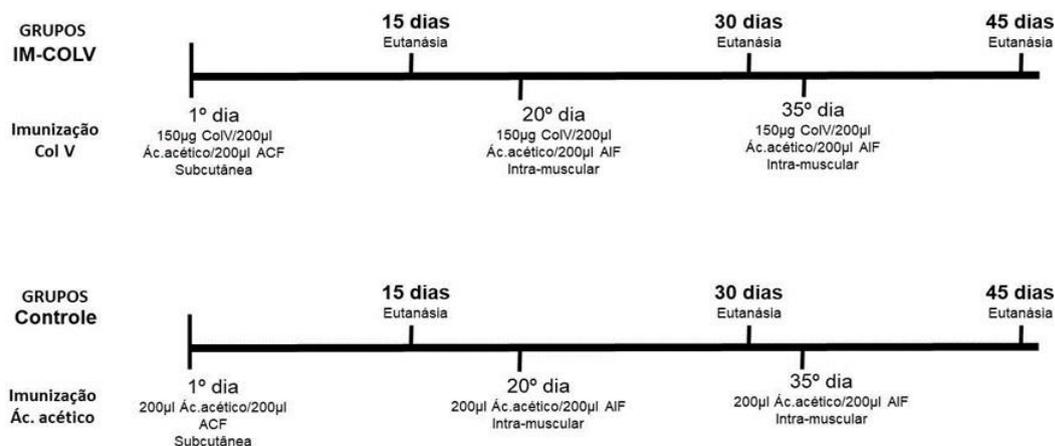


Figura 1– Esquema do protocolo de imunização com Col V para a indução do modelo de ES em camundongos C57BL/6 e controles. Grupos de estudo foram submetidos a eutanásia a 15, 30 e 45 dias IMU-COLV: imunizado com Col V.

3.2 Obtenção do Pulmão

Os animais de cada grupo foram anestesiados com Thiopental 50 mg/kg, por via intraperitoneal e submetidos a eutanásia, por meio de exsanguinação da veia cava. A região torácica foi exposta e o pulmão e coração removidos em bloco. Os pulmões direito e esquerdo foram separados, sendo fragmentos da região inferior do pulmão direito mantidos a -20°C para os ensaios bioquímicos de dosagem do colágeno total e a outra parte mantida em -80°C para ensaios moleculares. Por fim, fragmentos do esquerdo em solução de formol tamponado 10% para as análises morfométricas e de imuno-histoquímica.

3.3 Análise Morfológica do Pulmão

Para análise histológica, as amostras de pulmão foram mantidas por 24 horas em formol tamponado 10%, embebidas em parafina, cortadas numa espessura de 3-4µm e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), Tricrômico de Masson e Picrosirius.

3.4 Imunohistoquímica para α -AML, CD3, CD4, CD8, CD20, Caspase 3, VEGF e Fator VIII

A imunohistoquímica foi realizada para avaliação de α -AML, CD3, CD4, CD8, CD20, Caspase 3, VEGF e Fator 8, através do método da biotina-estreptoavidina-peroxidase. Resumidamente, cortes de tecido pulmonar de 3-4 μ m foram desparafinizadas em xilol quente, em estufas a 60°C, durante 5 minutos e na sequência 3 banhos em xilol frio. Para a hidratação desses tecidos, foi feito dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95% e um banho de álcool 70%, água corrente e deixadas em tampão fosfato pH 7,4 (TBS). O bloqueio da peroxidase endógeno presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10v (3%) 3x por 5 minutos. A recuperação dos sítios antigênicos realizada em alta temperatura em solução de ácido cítrico 10 Mm pH 6 (panela de pressão). Os anticorpos utilizados nas reações foram o anticorpo monoclonal de camundongo α -AML (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc. EUA); CD3 (1:1000 Vector Rabbit); CD4 (1:1000 Vector Rabbit); CD8 (1:1200 Vector Rabbit); CD20 (1:100 Vector Rabbit); Caspase 3 (1:4000 Vector); Fator VIII (1:200 Vector) e VEGF (1:400 Vector). Os cortes foram incubados com os anticorpos primários durante a noite a 4°C. Após isso, foi feita a incubação do anticorpo secundário (1:200 anti rabbit) por 30 minutos a 37°C. A 3,3 diaminobenzidina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) foi utilizada como cromogênio. Os cortes foram contracoloradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha HE). Para controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

3.5 Quantificação para Imunohistoquímica

Para quantificar as células imunomarcadas foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos, de acordo com Gundersen et. al., 1998 (70), com modificações, utilizando um sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus 6.0). Em resumo, o sistema de análise de imagem consiste em uma câmera fotográfica Olympus (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada), acoplada a um microscópio Olympus (Olympus BX51), a partir dos quais as imagens foram enviadas para um monitor LG, através de um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada) e transferido para um computador (Pentium 1330 Mhz). Utilizando-se os recursos de medidas do *Image-Pro Plus 6.0* foi construído um retículo com 100 pontos, distribuídos ortogonalmente sobre a imagem adquirida. Foram avaliados 10 campos do tecido pulmonar, num aumento de 1000x. A expressão de α -AML, CD3, CD4, CD8, CD20, Caspase 3, VEGF e Fator 8 foi determinada de acordo com o número de células positivas, coincidentes com os pontos do retículo em cada campo, sendo expressas como uma porcentagem de células positivas em relação ao número total de células.

3.6 Quantificação de Colágeno pela Dosagem da 4-hidroxi-prolina

A dosagem da 4-hidroxi-prolina 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 pulmonar 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, a 1 ml de amostra, compH neutro, foi adicionado 2ml de isopropanol e 1ml de solução oxidante, contendo cloramina T 7%. Esta mistura foi mantida por 4 minutos, em temperatura ambiente, para que ocorresse 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 µg/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 absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 560nm. Como controle de qualidade da reação foi utilizado um fator (F), com variação entre 9 e 13, calculado pela divisão do número 4 pela absorvância do padrão de 4-hidroxirolina. A concentração de 4-hidroxirolina foi expressa em µg de 4-hidroxirolina por mg de tecido pulmonar seco, de acordo com o cálculo abaixo.

$$\frac{F \times \text{Absorvância da amostra} \times \text{Volume do neutralizado} \times 2\text{ml (volume de HCL)}}{\text{Peso seco / úmido da amostra}}$$

Peso seco / úmido da amostra

Equação 1- Cálculo da concentração de 4-hidroxirolina.

3.7 Imunofluorescência para Colágeno dos Tipos I, III, V

Para a imunodeteção do colágeno dos tipos I, III e V, cortes de 4µm de amostras de pulmão foram aderidas em lâminas com aminosilane (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA).

As lâminas foram imersas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol, água corrente e destilada. Os sítios imunogênicos foram expostos pelo tratamento enzimático das amostras de pulmão com pepsina bovina (10,000 UTD; 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 PBS, as lâminas foram incubadas em 5% BSA, diluída em tampão fosfato pH 7,0.

As lâminas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com os anticorpos policlonais de coelho anticólageno do tipo I (Rockland), diluído 1:1200 em PBS, anticólageno tipo III (Rockland) diluído 1:1400 em PBS e anticólageno V (80) diluído 1:1000 em PBS.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 3 vezes (10min) em PBS com 0,05%

Tween20 e incubadas por 60 min com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho ALEXA 488 (INVITROGEN), diluído 1:200 em PBS, contendo 0,006% de azul de Evans. As lâminas foram novamente lavadas em PBS 0,05% Tween20 e montadas com glicerina tamponada. A reação foi visualizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX51).

3.8 Quantificação do Conteúdo de Colágeno dos Tipos I, III, V

A intensidade de imunofluorescência correspondente ao colágeno dos tipos I, III e V no parênquima pulmonar foi determinada por densidade óptica em um sistema de análise de imagem. O sistema utilizado consiste de uma câmera Olympus (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canadá) acoplada a um microscópio Olympus BX51, de onde as imagens são enviadas para um monitor (LG). Através de um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada) inserido em um computador Pentium 4, as imagens são processadas pelo software Image-Pro Plus 6.0.

Um total de 10 campos por caso, selecionados aleatoriamente, foram analisadas em um aumento de 400x. A área total do tecido analisado em cada campo foi medida pelo software Image-Pro Plus 6.0. O colágeno dos tipos I, III e V presentes nos campos adquiridos foi avaliado através da seleção de tonalidades verde fluorescentes, correspondentes às fibras de cada tipo de colágeno. A área das fibras de colágeno dos tipos I, III e V foi dividida pela área total de tecido analisado e o resultado final expresso em fração de área.

3.9 Extração de mRNA do Tecido Pulmonar

Após a coleta, o pulmão dos animais foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido, em tubos de criopreservação. Em seguida, as amostras foram armazenadas em um freezer a -80°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 pulmonar 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 200µl 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 500µl 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 30µl de H₂O 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.

3.10 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.

3.11 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	2 µl
MULTISCRIBE RT	1 µl
NUCLEASE FREE H2O	4,2 µl
VOLUME RNA	X µl com 1µg
NUCLEASE FREE H2O	X µl para completar o volume final
VOLUME FINAL	20µl

3.12 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: *Coll1a1* (cadeia α1 do colágeno I), *Col3a1* (cadeia α1 do colágeno III), *Col5a1* (cadeia α1 do colágeno V), *Col5a2* (cadeia α2 do colágeno V), *α-AML* (α-actina de músculo liso), *TGF-β1* (fator de crescimento transformador beta), *VIM* (Vimentina). As sequências dos genes foram adquiridas no site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide (**Tabela 3**). 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 1µL 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- Oligonucleotídeos

Gene	<i>Sense</i> 3' – 5'	<i>Antisense</i> 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
<i>α-AML</i>	GTC GAT GTG CAG TGT GTG AG	CTC GCC CAT GAC ATT CGA TG
<i>TGF-β</i>	ACT GCT TCC CGA ATG TCT GA	TCG CTT TGT ACA ACA GCA CC
<i>VIM</i>	CCT CCT GCA ATT TCT CTC GC	CGC TTT GCC AAC TAC ATC GA

A expressão diferencial dos genes de interesse foi determinada utilizando o método de cálculo do Delta Ct (Δ Ct), 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: Δ Ct = Ct gene de interesse - Ct 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 $\Delta\Delta CT$.

3.13 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 % ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise da Evolução do Remodelamento Pulmonar

Após de 15 dias de imunização com Col V, observamos a presença de um intenso infiltrado de células inflamatórias, localizadas ao redor dos vasos e brônquios (**Figura 2A**). Este infiltrado se expande ao redor dos septos alveolares e vasos nos animais do grupo IMU-COLV-15, quando comparamos com a distribuição celular normal, nos animais do grupo controle (**Figura 2D**). Este intenso infiltrado de células inflamatórias pode ser identificado ao redor de pequenos vasos e bronquíolos do interstício pulmonar, no grupo IMU-COLV-15 (**Figura 2E**) em relação ao controle (**Figura 2H**). No período de 30 dias após a imunização, IMU-COLV30, em menor aumento, observamos diminuição do infiltrado inflamatório e início do depósito de colágeno na região perivascular do grupo IMU-COLV-30 (**Figura 2B**). Interessante salientar que após 30 dias da imunização, o processo inflamatório encontra-se disseminado na região perivascular de pequenos vasos e bronquíolos, com fibras colágenas espessas em toda região peribrônquica, diferente do controle (**Figure 2D**). A **Figura 2F** mostra com mais detalhe, o intenso depósito de colágeno na região peribroncovascular, que se estende ao parênquima pulmonar nos animais do grupo IMU-COLV-30. Este depósito e o comprometimento do parênquima encontram-se ausentes no grupo de animais controle, como observamos na **Figura 2H**. Por outro lado, após 45 dias de imunização, em menor aumento (**Figura 2C**), observamos intenso remodelamento do parênquima pulmonar, vasos e brônquios nos animais do grupo IMU-COLV-45, já em maior aumento identificamos células inflamatória quase ausentes e substituição pelo intenso depósito de colágeno na parede dos vasos e interstício perivascular, destruição do interstício pulmonar, nos animais do grupo IMU-COLV-45 (**Figura 2G**), quando comparamos com os grupos controle (**Figura 2D e H**).

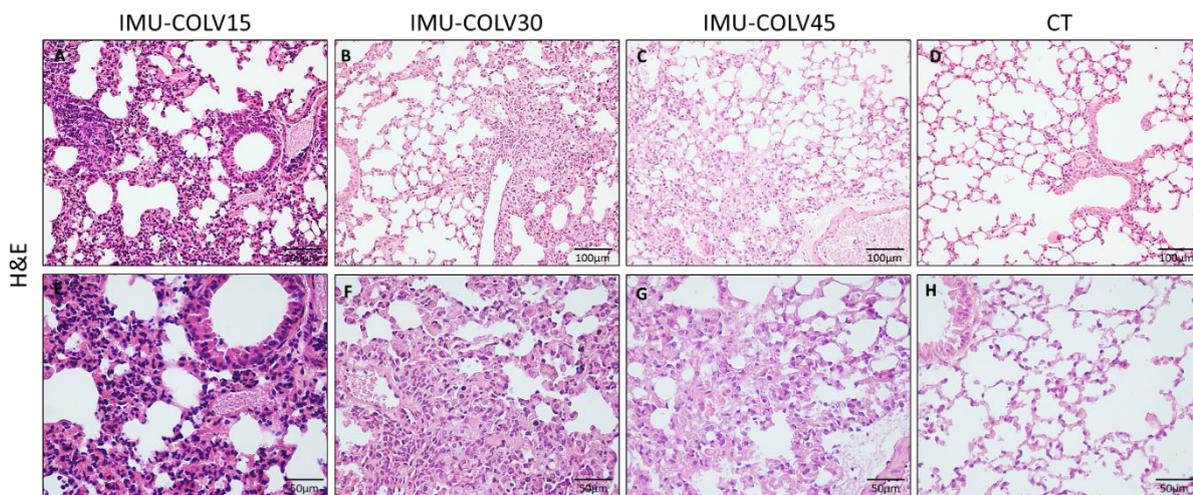


Figura 2– Micrografias de cortes histológicos transversais do tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 após 15, 30 e 45 dias de imunização com Col V (IMU-COLV) e controle (CT), coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

4.2 Análise Histomorfométrica de Células Inflamatórias no Tecido Pulmonar

Nossos resultados quantitativos da caracterização das células inflamatórias, mais uma vez confirmam aumento de linfócitos TCD3+ nos pulmões dos animais dos grupos IMU-COLV-15 dias, quando comparamos com os grupos IMU-COLV-30 dias ($12,65 \pm 4,780$ vs $8,469 \pm 2,142$, $p=0,0058$) e IMU-COLV-45 dias ($12,65 \pm 4,780$ vs $8,391 \pm 1,683$, $p=0,0047$) (**Figuras 3A-E**). Adicionalmente, considerando a análise temporal entre os grupos imunizados com Col V, observa-se um aumento significativo do infiltrado de linfócitos TCD4+ no pulmão do grupo IMU-COLV-15 dias em relação aos grupos IMU-COLV-30 dias ($33,99 \pm 2,007$ vs $23,38 \pm 2,034$, $p=0,0001$) e IMU-COLV-45 dias ($33,99 \pm 2,007$ vs $23,77 \pm 0,7395$, $p=0,0001$) (**Figura 3F-J**). Em relação à avaliação temporal para linfócitos TCD8+ no pulmão, identificamos aumento no grupo IMU-COLV-15 dias, em relação aos grupos IMU-COLV-30 dias ($39,40 \pm 2,426$ vs $22,87 \pm 2,090$, $p=0,0001$) e IMU-COLV-45 dias ($39,40 \pm 2,426$ vs $23,07 \pm 2,467$, $p=0,0001$) (**Figura 3K-O**). Também demonstramos na análise temporal entre os grupos imunizados, aumento significativo de linfócitos B CD20+ no pulmão dos animais do grupo IMU-COLV-15 dias, quando comparamos aos grupos IMU-COLV-30 dias ($34,14 \pm 3,811$ vs $27,50 \pm 3,224$, $p=0,0011$) e IMU-COLV-45 dias ($34,14 \pm 3,811$ vs $28,24 \pm 1,644$, $p=0,0044$) (**Figura 3P-T**).

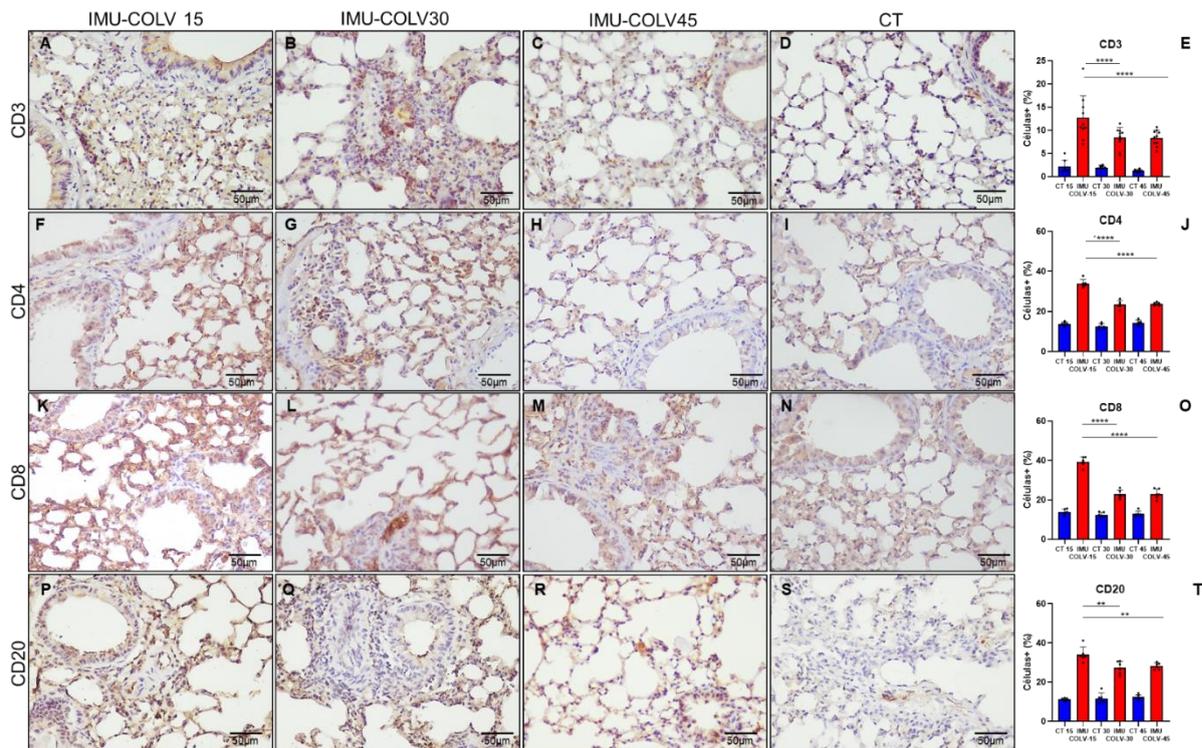


Figura 3- Expressão de CD3+, CD4+, CD8+ e CD20+ no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 após 15, 30 e 45 dias de imunização com Col V (IMU-COLV) e controle (CT). Marcação positiva em marrom. GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelos pós-testes de Tukey e Sidak.

4.3 Análise da Reatividade Vascular no Tecido Pulmonar

A análise da expressão de Fator VIII+ nas células endoteliais do pulmão dos grupos imunizados, mostrou intensa expressão de células Fator VIII+, principalmente na região perivascular (**Figura 4A**) muito diferente da imunomarcagem para Fator VIII+ nos grupos IMU-COLV-30, IMU-COLV-45 dias (**Figura 4B e C**) e controle (**Figura 4D**).

A análise temporal entre os grupos imunizados, também evidenciou aumento significativo na expressão do Fator VIII+ nos animais do grupo IMU-COLV-15, quando comparados aos grupos IMU-COLV-30 dias ($13,87 \pm 0,426$ vs $5,160 \pm 0,0983$, $p=0,0001$) e IMU-COLV-45 dias ($13,87 \pm 0,426$ vs $4,993 \pm 0,9047$, $p=0,0001$) (**Figura 4E**).

A análise das células endoteliais VEGF+ nos vasos do pulmão dos animais, mostrou aumento de VEGF+ no grupo IMU-COLV-15, em relação aos grupos IMU-COLV-30 e IMU-COLV-45 dias (**Figura 4F-I**). Esses dados foram confirmados através da análise quantitativa, que também demonstrou um aumento de células imunomarcadas

com VEGF+ no grupo IMU-COLV-15, quando comparado aos grupos IMU-COLV-30 ($3,807 \pm 0,782$ vs $2,635 \pm 0,569$, $p=0,0008$) e IMU-COLV-45 ($3,807 \pm 0,781$ vs $2,450 \pm 0,725$, $p=0,0001$) (**Figura 4J**).

Quando analisamos a imunomarcação para miofibroblastos, através da α -AML, no tecido pulmonar, identificamos aumento significativo na expressão de células α -AML+ nos animais do grupo IMU-COLV-45 dias (**Figura 4M**), em relação aos grupos IMU-COLV-15dias ($29,45 \pm 5,386$ vs $23,43 \pm 2,521$, $p=0,0051$) e IMU-COLV-30 dias ($29,45 \pm 5,386$ vs $24,54 \pm 2,312$, $p=0,0421$) e controle (**Figuras 4K,L,N,O**). Quanto a nossa análise da imunomarcação para Caspase-3 no endotélio da microvasculatura pulmonar, observamos aumento significativo da expressão de células Caspase-3+ no grupo IMU-COLV-45 dias, quando comparamos ao grupo IMUCOLV-30 dias ($13,60 \pm 2,756$ vs $9,890 \pm 1,786$, $p=0,0161$) e controle (**Figuras 4P-T**).

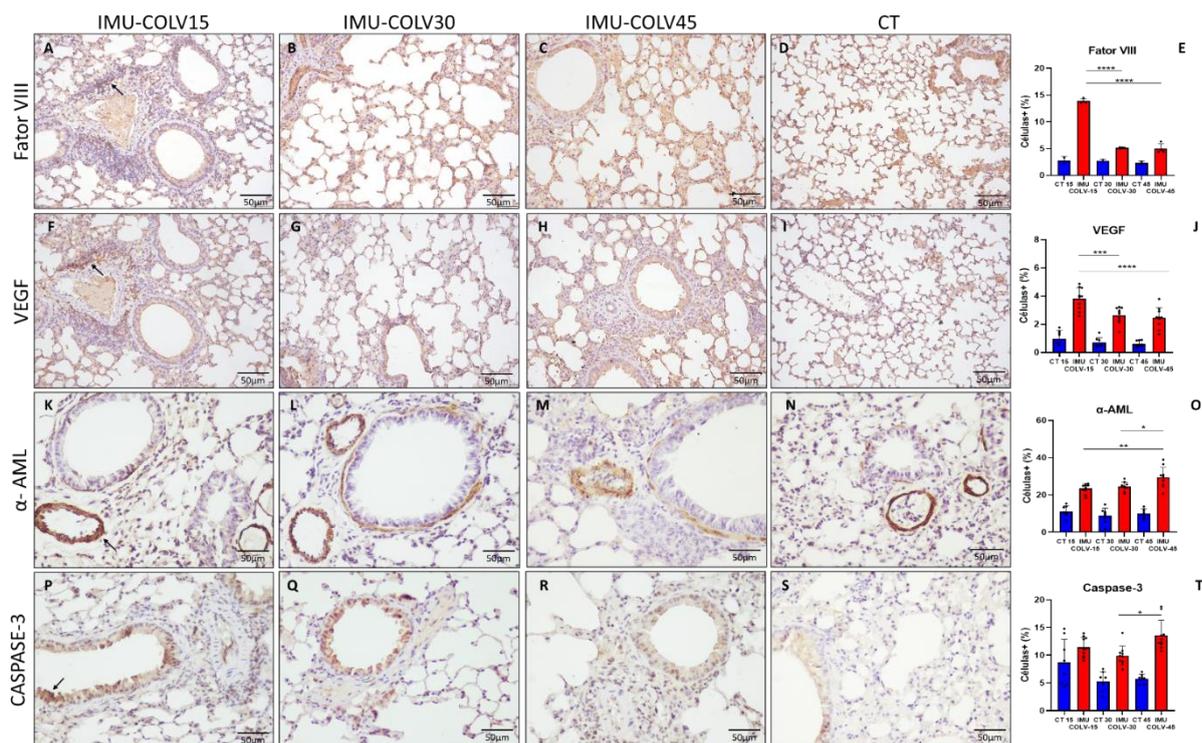


Figura 4- Expressão de células positivas para Fator VIII, VEGF+, α -AML e Caspase-3 no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 após 15, 30 e 45 dias de imunização com Col V (IMU-COLV) e controle (CT). Marcação positiva em marrom. GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelos pós-testes de Tukey e Sidak.

4.4 Análise Do Remodelamento Do Interstício No Tecido Pulmonar

Quando analisamos a histoarquitetura das fibras de colágeno pelo Tricrômico de Masson e Picosirius-Red, confirma-se o padrão morfológico encontrado no H&E (**Figura 2 A-H**) identificando nos animais do grupo IMU-COLV-15 dias (**Figura 5A e E**), as fibras de colágeno distribuídas ao redor dos vasos e brônquios, obedecendo a um padrão normal no tecido pulmonar, semelhante ao grupo controle (**Figura 5D e H**). Por outro lado, no grupo IMU-COLV-30 dias, observa-se fibras de colágeno mais delgadas e fibras espessas circundando a região perivascular, resultando em um padrão histológico heterogêneo, típico do início de remodelamento do tecido pulmonar (**Figura 5B e F**). Nos animais do grupo IMU-COLV-45 dias (**Figure 5C e G**), o processo se intensifica e se modifica para um padrão desorganizado de fibras de colágeno representadas pelo azul intenso, na região peribrônquica vascular em comparação com controle (**Figura 5 D e H**).

Estes resultados são confirmados pela dosagem bioquímica quantitativa da 4-hidroxi-prolina, indicando aumento de colágeno total no tecido pulmonar nos animais do grupo IMU-COLV-45 dias em relação aos grupos IMU-COLV-15 dias ($5,203 \pm 1,350$ vs $3,773 \pm 1,006$, $p=0,0091$) e IMU-COLV-30 dias ($5,203 \pm 1,350$ vs $3,213 \pm 0,4715$, $p=0,0001$) (**Figura 5 I**).

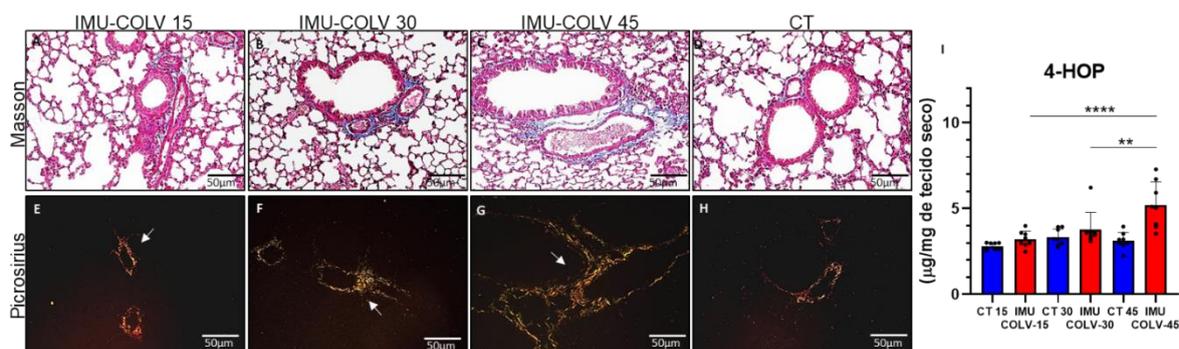


Figura 5- Imagens representativas do perfil morfológico do colágeno da região brônquica dos pulmões de camundongos dos grupos de 15, 30 e 45 dias de imunização com Col V (IMU-COLV: Painéis A, B, C, E, F e G) e controles (Painel D e H). Coloração com Tricrômico de Masson e Picosirius, adquirida sob polarização. As setas indicam a localização e histoarquitetura das fibras de colágeno no tecido. Aumento de 400x.

Quanto à constituição dos tipos de colágeno encontrados, observamos na **Figura 6A**, uma tênue expressão de colágeno do tipo I (Col I), que se estende ao redor de vasos e brônquios, no grupo IMU-COLV-15dias. No grupo IMU-COLV-30 dias começa a se depositar ao redor dos brônquios e parede de vasos (**Figura 6B**), comparado ao grupo controle (**Figura 6D**). Já análise da expressão de Col I no grupo IMU-COLV-45 dias (**Figura 6C**), mostramos uma expressão elevada de Col I por todo tecido pulmonar, disseminando em direção aos septos alveolares e espessando as paredes dos vasos, em relação ao grupo IMU-COLV-15 dias (**Figura 6A**). A análise quantitativa confirma nossa análise morfológica, demonstrando que neste período a fibrose já está estabelecida neste grupo ($39,76 \pm 7,18$ vs $20,29 \pm 4,66$, $p=0,0240$) (**Figura 6E**).

Com relação à expressão de colágeno do tipo III (Col III) no pulmão, é possível identificar o Col III nos vasos e brônquios obedecendo um padrão semelhante ao dos animais controle no IMU-COLV-15 dias (**Figura 6F e I**). Por outro lado, no grupo IMU-COLV-30dias, observa-se um aumento de Col III, ao redor de vasos, brônquios que se expande no parênquima pulmonar (**Figura 6G**). Entretanto, no grupo IMU-COLV-45 dias, a expressão desta proteína está aumentada em todo o interstício pulmonar (**Figura 6H**), quando comparamos aos animais do grupo IMU-COLV-15 dias e controle (CT), respectivamente (**Figuras 6F e I**). Novamente, a análise quantitativa corroborou com nossos dados morfológicos, apresentando significância estatística entre os grupos IMU-COLV-30 e IMU-COLV-15 dias ($31,04 \pm 7,20$ vs $21,67 \pm 4,41$, $p=0,0059$), e os grupos IMU-COLV-45 e IMU-COLV-15 dias ($30,53 \pm 4,01$ vs $21,67 \pm 4,41$, $p=0,0107$) (**Figura 6J**).

Quando analisamos a expressão de Col V, evidenciamos um padrão de fibras finas circundando o interstício pulmonar e a parede da microvasculatura pulmonar e brônquios nos grupos IMU-COLV-15, IMU-COLV-30, IMU-COLV-45 dias e CT (**Figuras 6K-N**). Novamente, esta análise quantitativa apoia nossos achados morfológicos, pois mostrou diminuição nos grupos IMU-COLV-30 e IMU-COLV-45 dias em relação grupo IMU-COLV-15 dias ($11,26 \pm 1,24$ vs $9,24 \pm 1,28$, $p=0,0181$; $11,26 \pm 1,24$ vs $8,65 \pm 1,34$, $p=0,0031$) (**Figuras 6O**), onde obtive um aumento estatisticamente significativo em relação aos outros grupos estudados.

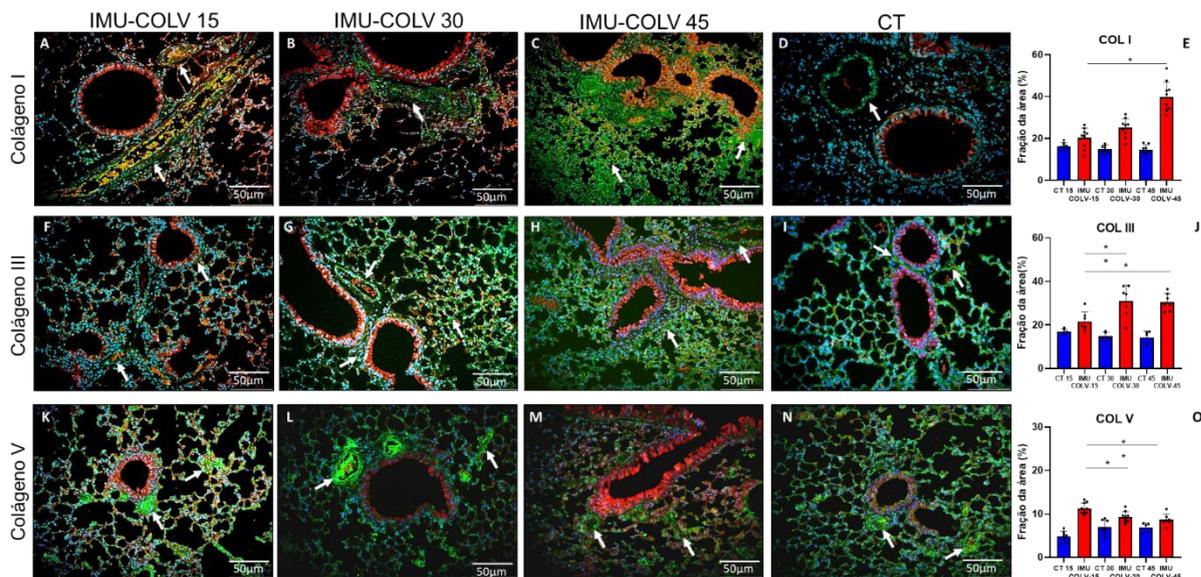


Figura 6- Expressão de Colágeno I, III e V no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 após 15, 30 e 45 dias de imunização com Col V (IMU-COLV) e controle (CT). Marcação positiva em verde fluorescente. . GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelos pós-testes de Tukey e Sidak.

4.5 Expressão dos genes *Colla1*, *Col3a1*, *Col5a1*, *Col5a2*, *Tgf-β*, *α-Aml*, *Vimentina*

O RNAm total extraído do tecido pulmonar 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 análise da expressão do gene *Tgf-β*, uma das proteínas mais importantes na patogênese da ES, demonstrou que houve diferença significativa na expressão relativa para este gene no grupo IM-COLV-45 dias em relação aos grupos IMU-COLV-15 dias ($2,46 \pm 0,81$ vs $0,93 \pm 0,64$, $p < 0,0001$) e IMU-COLV-30 dias ($2,46 \pm 0,81$ vs $1,16 \pm 0,84$, $p = 0,0003$) (**Figura 7A**). O mesmo foi observado em relação a expressão dos genes de α -*Aml* ($2,79 \pm 0,78$ vs $1,03 \pm 0,45$, $p < 0,0001$; $2,79 \pm 0,78$ vs $1,43 \pm 0,36$, $p < 0,0001$) (**Figura 7B**) e Vimentin ($2,24 \pm 0,38$ vs $1,09 \pm 0,48$, $p < 0,0001$; $2,24 \pm 0,38$ vs $1,41 \pm 0,37$, $p < 0,0001$) (**Figura 7B e C**).

Ainda, a avaliação da expressão dos genes para os principais tipos de colágeno, encontrados no tecido pulmonar, demonstrou que a expressão relativa, para o gene que codifica a cadeia $\alpha 1$ do colágeno I (*Colla1*) encontrasse aumentada no grupo IMU-

COLV-45 dias em relação aos grupos IMU-COLV-15 dias ($2,98 \pm 1,01$ vs $1,65 \pm 0,38$) e IMU-COLV-30 dias ($2,98 \pm 1,01$ vs $1,66 \pm 0,31$) (**Figura 7D**). O mesmo foi observado em relação a expressão relativa, para o gene que codifica a cadeia $\alpha 1$ do colágeno III (*Col3a1*), havendo diferença significativa no grupo IMU-COLV-45 dias em relação aos grupos IMU-COLV-15 ($3,26 \pm 0,76$ vs $1,58 \pm 0,36$) e IMU-COLV-30 dias ($3,26 \pm 0,76$ vs $1,38 \pm 0,13$) (**Figura 7E**).

Por outro lado, a expressão relativa para o gene que codifica a cadeia $\alpha 1$ do colágeno V (*Col5a1*), demonstrou diferença significativa no grupo IMU-COLV-15 dias em relação aos grupos IMU-COLV-30 ($2,78 \pm 0,76$ vs $1,29 \pm 0,48$) e IMU-COLV-45 dias ($2,78 \pm 0,76$ vs $1,86 \pm 0,30$) (**Figura 7F**). Novamente, a expressão da cadeia $\alpha 2$ do Col V (*Col5a2*) também demonstrou aumento significativo no grupo IMU-COLV-15 dias em relação aos grupos IMU-COLV-30 ($2,94 \pm 0,88$ vs $1,02 \pm 0,73$) e IMU-COLV 45 dias ($2,94 \pm 0,88$ vs $1,81 \pm 0,52$) (**Figura 7G**).

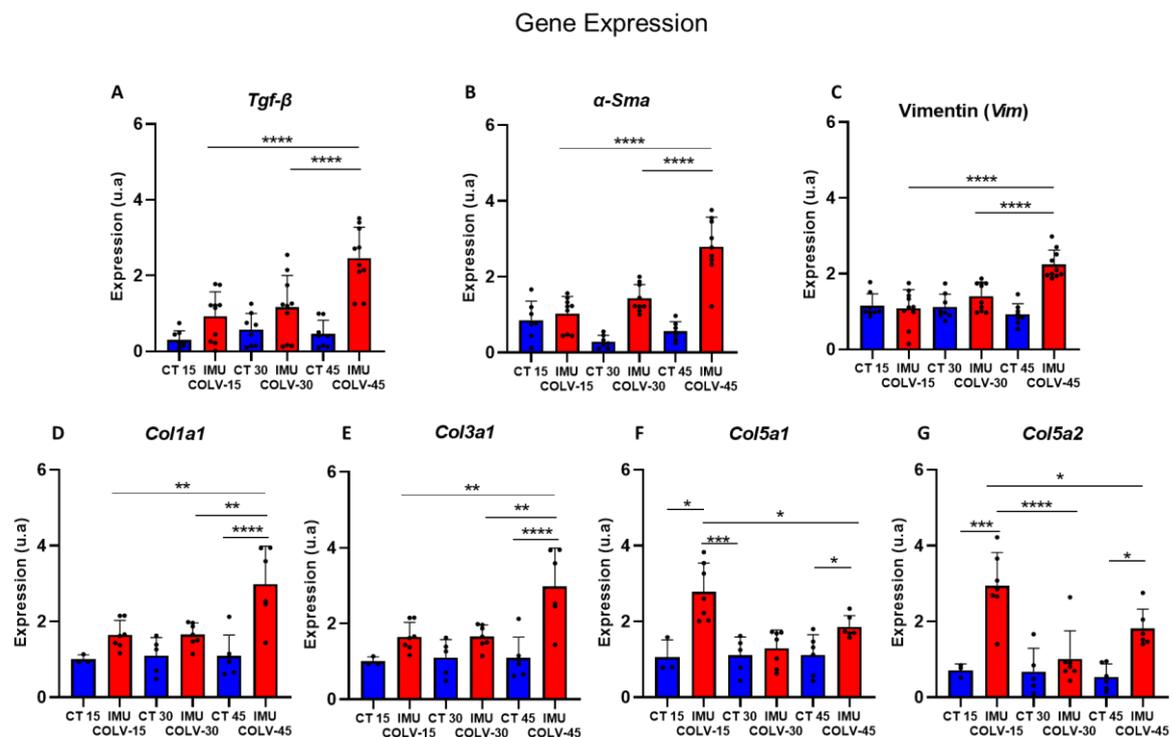


Figura 7- Expressão relativa dos genes TGF-β, A-AML, Vimentina, COL1A1, COL3A1, COL5A1 e COL5A2 no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 após 15, 30 e 45 dias de imunização com Col V e controle. GraphPad Prism versão 8; Anova one way, seguido pelos pós-testes de Tukey e Sidak.

5. DISCUSSÃO

Considerando que as complicações pulmonares na esclerose sistêmica (ES) podem afetar drasticamente a qualidade de vida e o prognóstico dos pacientes, é crucial enfatizar a importância da detecção precoce da progressão das manifestações pulmonares em modelos pré-clínicos. Essa abordagem pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento de terapias destinadas a atenuar a progressão da fibrose pulmonar associada à ES.

Neste estudo, observou-se que, após 15 dias de indução da ES com Col V, há uma intensa reatividade vascular mediada pelos fatores angiogênicos VEGF e Fator VIII. Além disso, foi identificada uma resposta imune exagerada, caracterizada por um infiltrado de linfócitos T totais (CD3+), com marcadores de membrana CD4+ e CD8+, bem como linfócitos B (CD20+), indicando a fase inicial do modelo de ES. Adicionalmente, nesta fase inicial, destaca-se a regulação positiva dos genes *Col5a1* e *Col5a2*, responsáveis pela síntese das cadeias *ColV α 1* e *ColV α 2*, respectivamente, resultando em um aumento do depósito de Col V no tecido pulmonar. Este achado sugere o envolvimento do Col V no processo inicial de formação da fibrose pulmonar na ES..

Aos 30 dias após a indução, o processo de evolução da fibrose continua a demonstrar uma diminuição do infiltrado de células imunes, um aumento da α -actina de músculo liso (α -AML) e a ativação do remodelamento das proteínas da matriz extracelular (MEC). Esse processo envolve um aumento do colágeno III (Col III) e do colágeno I (Col I), juntamente com uma diminuição do Col V, indicando uma fase regenerativa, com a participação ativa das proteínas da MEC e diferenciação celular.

Quando avaliamos aos 45 dias após a indução de ES, a fibrose pulmonar progride, caracterizado pelo aumento de colágeno no interstício e na região broncovascular, aumento da α -actina do músculo liso e do Col I. Além disso, reforçando nossos achados, identificamos uma regulação positiva dos genes *Colla1*, *Col3a1*, Vimentina (*Vim*), α -*Aml* e *Tgfb-1*, após 45 dias de indução de ES, houve uma regulação positiva dos genes *Colla1*, *Col3a1*, Vimentina (*Vim*), α -*Aml* e *Tgfb-1*, indicando a fase fibrótica do remodelamento pulmonar no modelo IMU-COLV.

Nossos resultados demonstram a importância de compreender as várias fases do remodelamento pulmonar na esclerose sistêmica (ES) e como a proporção da matriz fibrilar pode ativar mecanismos que envolvem a produção de proteínas, desencadeando

respostas imunológicas e influenciando a diferenciação dos fibroblastos, o que, resulta na produção de colágeno.

Entre os mecanismos que poderiam ser ativados através da imunização com Col V e que são candidatos ao desenvolvimento da fibrose intersticial pulmonar encontrada na ES, temos o papel do endotélio, que inicia e perpetua a vasculopatia associada à ES. No início da doença ocorre o dano endotelial, desencadeando vasoconstrição e fibrose subendotelial. Estas alterações contribuem para o desenvolvimento de trombose intraluminal e espessamento das camadas musculares dos vasos sanguíneos (71). Além disso, a angiogênese anormal, impulsionada pela expressão aumentada de fatores angiogênicos como o PDGF, o VEGF, o ET-1 e o TGF- β , é uma característica distintiva da ES (72). Curiosamente, no modelo IMU-COLV, o VEGF e o Fator VIII apresentaram-se aumentados em 15 dias após a indução da doença, indicando que as alterações vasculares ocorrem mais precocemente no modelo estudado.

A vasculopatia é considerada um gatilho primário para a resposta imune exagerada observada em pacientes com ES. Nos estágios iniciais da doença, a infiltração linfocítica dos tecidos afetados é evidente (73). De fato, aos 15 dias, as alterações vasculares pulmonares foram concomitantes ao infiltrado celular no modelo IMU-COLV. Essa infiltração de células imunes foi caracterizada por abundantes células T e B no tecido pulmonar. Os linfócitos T de pacientes com ES apresentam uma expressão aumentada de marcadores de ativação. Notavelmente, as células Th2 (produtoras de IL-4 e IL-13) e as células Th17 (produtoras de IL-17) estão significativamente aumentadas, tanto na pele quanto no sangue periférico, particularmente naqueles com a forma difusa da doença (74).

Neste estudo, o infiltrado de linfócitos T CD4+ e CD8+ foi mais expresso nas fases iniciais do modelo IMU-COLV em relação aos 45 dias. Do mesmo modo, encontramos um infiltrado abundante de linfócitos B no pulmão nas fases iniciais deste modelo. Já foi identificado que pacientes com ES apresentam homeostase anormal de linfócitos B, caracterizada por um número elevado de linfócitos B ativados e linfócitos B de memória reduzidos. Os linfócitos B ativados desempenham múltiplos papéis críticos na patogênese da ES: segregam IL-6, que induz a diferenciação de macrófagos M2. Além disso, os autoanticorpos são detectados em 95% dos pacientes com ES, o que sublinha o seu papel significativo na patologia da doença (75).

Importante mencionar que neste estudo a presença de um grande número de linfócitos B no tecido pulmonar nas fases iniciais do modelo IMU-COLV, corrobora com

o estudo anterior, onde caracterizamos a presença de autoanticorpos no soro dos animais aos 120 dias após a primeira imunização (47). Interessante, no modelo IMU-COLV, no período de 15 dias, as manifestações pulmonares foram marcadas por alterações vasculares e um grande infiltrado de células imunes, diferindo dos períodos de 30 e 45 dias. Durante esta última fase, a expressão de marcadores celulares foi reduzida, dando lugar a um aumento na expressão de colágeno e miofibroblastos, conforme sinalizado pela expressão de α -AML. De fato, já é determinado que na patogênese da ES, à medida que a fibrose intersticial progride, os infiltrados tornam-se escassos em fases posteriores (73).

Estes resultados podem indicar que o modelo IMU-COLV é caracterizado por uma disfunção endotelial, que conduz a manifestações vasculares, desencadeando uma resposta imune anormal de linfócitos T e B. A desregulação imune contribui provavelmente para a persistência da fibrose, através de interações que envolvem várias citocinas, como o TGF- β . Salientamos que, os linfócitos B têm o potencial de promover a fibrose, através da secreção de TGF- β . Ainda, os linfócitos Th2, envolvidos na resposta humoral têm um perfil de citocinas, como IL4, IL6 e IL13, importantes no desenvolvimento e agravamento da fibrose pulmonar na ES (76). Embora, neste estudo não tenhamos avaliado o perfil das citocinas presentes no pulmão no modelo IMU-COLV durante o desenvolvimento da doença, a expressão do gene para TGF- β , principal citocina fibrogênica, é mais um indício de que a fase inicial inflamatória precede o estabelecimento da fibrose. Compreender esses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de terapias eficazes no tratamento da ES.

Como mencionado, vários modelos de ES têm sido desenvolvidos para investigar a desregulação imunológica e a fibrose pulmonar associada. No entanto, há uma lacuna significativa na literatura quanto à progressão do processo fibrótico nos modelos existentes. Um estudo conduzido por Meng et al. (2019) (77) avaliou a evolução da fibrose pulmonar em um modelo experimental induzido por Ácido hipocloroso (HOCl), observando um aumento nos infiltrados de células imunes, incluindo linfócitos T CD4+ e CD8+, além de linfócitos B CD19+, após 6 semanas de indução. Por outro lado, no modelo IMU-COLV, o processo inflamatório foi detectado após 15 dias de indução de ES. A fibrose pulmonar foi estabelecida com aumento da expressão de TGF β e α -AML no modelo induzido por HOCl após 6 semanas, resultados consistentes com nossos dados no modelo IMU-COLV aos 30 e 45 dias de indução. Adicionalmente, no que se refere ao

desenvolvimento de fibrose, determinada pelo aumento da 4-hidroxiprolina, os achados de Meng et al. (2019), corroboram nossos resultados, bem como as alterações morfológicas típicas associadas à fibrose intersticial pulmonar após 30 dias de indução (77).

Outros modelos habitualmente utilizados para estudar a fibrose intersticial pulmonar na ES incluem o modelo de camundongo com topoisomerase I (TopoI). Neste modelo, a fibrose pulmonar foi avaliada às 2, 4, 6 e 8 semanas após a indução da ES. No entanto, o estabelecimento do processo inflamatório e da fibrose só foi observado após 8 semanas da administração de TopoI. Mais uma vez, o nosso estudo destaca-se entre os modelos mais utilizados para a investigação do processo de fibrose na ES (78).

Para elucidar o mecanismo subjacente à formação fibrilar alterada da fibrose no modelo IMU-COLV e o papel do Col V neste processo, avaliamos o remodelamento do tecido pulmonar, através da análise de vários tipos de colágeno e dos seus padrões morfológicos. Nossos achados indicam que o processo de formação e constituição da fibrose, apresenta um perfil de síntese distinto em comparação com a fibrose reparadora. As modificações na constituição da fibrose pulmonar no modelo IMU-COLV foram previamente observadas por Teodoro et al., 2019 (79). Estas foram semelhantes ao padrão morfológico da fibrose intersticial desenvolvida em pacientes com ES. Tanto em animais, quanto em pacientes com ES, além do aumento da síntese de colágeno, foi identificada a presença de Col V estruturalmente anômalo, com fibras mais curtas e espessas, com distribuição heterogênea (80).

Estudos demonstraram que pacientes com ES apresentam um aumento na expressão do Col V, do gene COL5A2 e da cadeia $\alpha 2(V)$ na pele e no pulmão, nos estágios mais precoces da ES (81–83). Além disso, também foi demonstrado que a deposição anômala de Col V na pele de pacientes com ES correlacionou-se com o espessamento da pele e a atividade da doença (83). Estes resultados, aliados ao fato de a tolerância nasal com Col V no modelo experimental de esclerodermia em coelhos, diminuir o processo inflamatório e o processo fibrótico no pulmão e na pele, para além de reduzir a expressão de TGF- β , são mais uma evidência de que o Col V desempenha um papel na patogênese da ES, como neoantígeno que desencadeia uma resposta autoimune (49,84).

No presente estudo, observamos uma grande concentração de células inflamatórias ao redor de vasos e brônquios 15 dias após a indução da doença. Essas células imunes se estendem para o interstício pulmonar, septos alveolares e região

perivascular. Este processo está associado ao aumento da síntese dos genes *Col5a1* e *Col5a2*, resultando em níveis elevados da proteína (Col V). Os *Col5a1* e *Col5a2* são genes que codificam as cadeias alfa do Col V. O Col V é um componente menor do tecido conjuntivo encontrado em tecidos que contêm colágeno tipo I. Este colágeno regula a formação de fibras heterotípicas compostas por colágeno de tipo I e de tipo V, contribuindo para a resistência dos tecidos, regula a formação do colágeno e tem funções específicas nos tecidos dependendo de sua isoforma molecular. A sua presença, juntamente com outros tipos de colágeno, assegura o bom funcionamento de vários órgãos e estruturas. O Col V pertence ao grupo dos colágenos fibrilares, que têm uma porção fibrilar constituída por três cadeias α , dispostas sob a forma de uma tripla hélice helicoidal. É uma minoria em relação aos outros colágenos, cerca de 2 a 5%, mas tem uma ampla distribuição, localizando-se principalmente entre a membrana basal e o tecido conjuntivo adjacente, em tecidos como o pulmão, pele, baço, córnea, fígado, entre outros.

O Col V tem três isoformas: o homotrímero, composto por três cadeias α idênticas [$\alpha 1(V)3$], o heterotrímero composto por três cadeias α distintas [$\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ e $\alpha 3(V)$] (85–89) e o heterotrímero, composto por duas cadeias $\alpha 1(V)$ e uma cadeia $\alpha 2(V)$ [$\alpha 1(V)2$, $\alpha 2(V)$], que é o mais comum e está presente na maioria dos tecidos. Além disso, a Col V é uma proteína extremamente conservada entre espécies e copolimeriza com os tipos I e III para formar fibrilas heterotípicas (I/III/V). A porção helicoidal tripla da molécula de Col V está integrada nestas fibrilas, com o domínio globular amino-terminal (-NH₃) projetado para a superfície (87,90). Este domínio globular regula o crescimento da fibrila, impedindo fisicamente a adição de novos monómeros à fibrila. Devido a esta característica, o Col V tem uma função importante na organização, crescimento e dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas, sendo atualmente considerado o nucleador da fibrilogênese do colágeno tipo I (53,54,85,91–93).

É importante mencionar que a indução da ES com Col V e a observação de uma intensa reatividade vascular nos primeiros 15 dias são achados significativos. A ativação de fatores angiogênicos, tais como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e o Fator VIII, sugere um papel crucial na patogênese das complicações pulmonares, possivelmente contribuindo para a formação de novos vasos sanguíneos que podem estar associados à inflamação e fibrose pulmonar. A resposta imunológica exacerbada, evidenciada pelo aumento dos linfócitos T totais (CD3+), linfócitos CD4+ e CD8+, bem como dos linfócitos B (CD20+), indica um estado inflamatório ativo e a mobilização do

sistema imunitário. Estes marcadores são relevantes para a compreensão das complexas interações entre a resposta imunitária e a fibrose pulmonar, bem como para a identificação de potenciais alvos para intervenções terapêuticas.

Em relação às alterações pulmonares encontradas após 30 dias, podemos destacar a estabilização do processo inflamatório e o início do remodelamento da matriz, indicado pelo perfil morfológico das células inflamatórias e alterações na histoarquitetura das fibras colágenas, que se apresentaram mais espessas quando observadas pelo tricrômico de Masson e Picrosirius, aliadas a um aumento de Col I e Col III neste período.

Dando continuidade à evolução do processo fibrótico pulmonar após 45 dias, justificam-se as alterações morfológicas encontradas por HE, tricômico de Masson e Picrosirius, pois, além do padrão de fibrose intersticial, semelhante à doença em humanos, identificamos um aumento da 4-hidroxirolina no tecido pulmonar indicando uma fase fibrótica do modelo estudado.. Corroborando com esses achados, identificamos um aumento na expressão dos genes para *Colla1*, *Colla3*, α -*Aml*, Vimentina (*Vim*) e principalmente *Tgf- β* , que durante esse período volta a aumentar e conseqüentemente participa da formação da fibrose. Estes resultados são semelhantes aos descritos em pulmões de animais no modelo experimental induzido por HOCl e reforça a importância da indução de ES com Col V. Foi também identificado um aumento de α -AML e vimentina, bem como abundante infiltrado inflamatório (células T CD4+, células T CD8+ e células B CD19+) e extensa consolidação do parênquima pulmonar com perda da arquitetura alveolar, no modelo induzido por HOCl.

Outro achado importante do nosso estudo, que pode indicar um caminho para elucidar a interferência do Col V na ES, é o aumento do mRNA para TGF- β após 45 dias de imunização. Sabemos que, o TGF- β tem um papel importante na fibrose cardíaca e na doença arterial periférica, e o seu aumento progressivo está relacionado com o avanço da gravidade e aumento da deposição de colágeno (94). Sabe-se que o TGF β 1 é uma citocina multipotente responsável por regular o crescimento e a diferenciação celular, bem como a organização da matriz extracelular no tecido dérmico, além de estimular a angiogênese e a vasodilatação em cicatrizes hipertróficas. (95). O Col5a2 (COL5A2) e o Tgf- β 1 (TGF- β 1) possuem pontos de interação comuns. No entanto, não existem dados disponíveis sobre os seus efeitos inibidores ou estimuladores na expressão um do outro.

Assim, os dados obtidos através do estudo neste modelo experimental, não só elucidam os mecanismos subjacentes às complicações pulmonares na ES, como também

realçam a importância do diagnóstico precoce e de estratégias de monitorização contínua. Os avanços na compreensão destes processos poderão abrir caminho a novos tratamentos que possam atenuar a progressão da fibrose pulmonar e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dos doentes afetados pela esclerose sistêmica.

6. CONCLUSÃO

Após a análise da evolução da fibrose pulmonar no modelo IMU-COLV, podemos concluir:

Após 15 dias de indução: Observou-se a fase inflamatória precoce, caracterizada por uma reatividade vascular positiva para VEGF e Fator VIII. A resposta imune foi marcada pelo aumento da presença de linfócitos T e B, correlacionando-se com a elevação na expressão dos genes *Col5a1* e *Col5a2*. Esses resultados sugerem que a fase inicial da fibrose está associada a um aumento da inflamação e à ativação de vias de cicatrização.

Após 30 dias de indução: Essa fase revelou uma transição para a fase reparativa, demonstrando diminuição das células inflamatórias, indicando que a inflamação aguda estava cedendo. Simultaneamente, houve um início do remodelamento pulmonar, evidenciado pelo aumento do colágeno III e diminuição do colágeno V, sugerindo uma tentativa do organismo de restabelecer a integridade do tecido pulmonar.

Após 45 dias de indução: Identificamos a fase fibrótica, com um padrão de fibrose intersticial pulmonar, refletindo a progressão do processo, devido ao aumento do colágeno total, bem como da expressão de vimentina, α -actina de músculo liso, colágeno I, colágeno III dos genes *Colla1*, *Col3a1*, *Tgf- β* , *α -Aml*, *Vimentina*, caracterizando a fase fibrótica do modelo estudado..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARTLETT CM. Animal models of systemic sclerosis: Their utility and limitations. . *Open Access Rheumatology: Research and Reviews*. 2014;6:65–81.
2. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, et al. Endothelial Fli1 Deficiency Impairs Vascular Homeostasis : A Role in Scleroderma Vasculopathy. *Am J Pathol*. 2010;176(4):1983.
3. Asano Y SS. Animal models of scleroderma: Current state and recent development. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(12).
4. Atzeni F, Gerardi MC, Barilaro G, Masala IF, Benucci M, Sarzi-Puttini P. Interstitial lung disease in systemic autoimmune rheumatic diseases: a comprehensive review. <https://doi.org/101080/1744666X20181411190>. 2 de janeiro de 2017;14(1):69–82.
5. Aurangabadkar GM, Aurangabadkar MY, Choudhary SS, Ali SN, Khan SM, Jadhav US. Pulmonary Manifestations in Rheumatological Diseases. *Cureus*. 26 de setembro de 2022;14(9).
6. Benfaremo D, Svegliati S, Paolini C, Agarbati S, Moroncini G. Systemic Sclerosis: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines*. 1º de janeiro de 2022;10(1).
7. 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).
8. Bilgici A, Ulusoy H, Kuru O, Çelenk Ç, Ünsal M, Danaci M. Pulmonary involvement in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 28 de agosto de 2005;25(6):429–35.
9. De Pieri A, Korman BD, Jüngel A, Wuertz-Kozak K. Engineering Advanced In Vitro Models of Systemic Sclerosis for Drug Discovery and Development. *Adv Biol*. 1º de abril de 2021;5(4):e2000168.
10. Martinović Kaliterna D, Petrić M. Biomarkers of skin and lung fibrosis in systemic sclerosis. <https://doi.org/101080/1744666X20201670062>. 2 de novembro de 2019;15(11):1215–23.
11. Campochiaro C, Hoffmann-Vold AM, Avouac J, Henes J, de Vries-Bouwstra J, Smith V, et al. Sex influence on outcomes of patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: an EUSTAR database analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 22 de novembro de 2022;keac660–keac660.
12. Hughes, M., & Herrick AL. Systemic sclerosis. *Br J Hosp Med*. 2019;80(9):530–6.
13. Hoffmann-Vold AM, Allanore Y, Alves M, Brunborg C, Airó P, Ananieva LP, et al. Progressive interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease in the EUSTAR database. *Ann Rheum Dis*. 1º de fevereiro de 2021;80(2):219.
14. Rokni M, Sadeghi Shaker M, Kavosi H, Shokoofi S, Mahmoudi M, Farhadi E. The role of endothelin and RAS/ERK signaling in immunopathogenesis-related fibrosis in patients with systemic sclerosis: an updated review with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*. 1º de dezembro de 2022;24(1).
15. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, Cipriani P, Conforti ML, Guiducci S, et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and

- are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res.* 2002;4(6):R11.
16. Gabrielli A, Avvedimento E V., Krieg T. Scleroderma. *New England Journal of Medicine.* 7 de maio de 2009;360(19):1989–2003.
 17. Fleming JN, Nash RA, McLeod DO, Florentino DF, Shulman HM, Connolly MK, et al. Capillary Regeneration in Scleroderma: Stem Cell Therapy Reverses Phenotype? *PLoS One.* 16 de janeiro de 2008;3(1):e1452.
 18. Moroncini G, Grieco A, Nacci G, Paolini C, Tonnini C, Pozniak KN, et al. Epitope specificity determines pathogenicity and detectability of anti-platelet-derived growth factor receptor α autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatology.* 1º de julho de 2015;67(7):1891–903.
 19. Maurer B, Distler A, Suliman YA, Gay RE, Michel BA, Gay S, et al. Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1º de outubro de 2014;73(10):1880–7.
 20. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 1º de março de 2011;10(5):276–81.
 21. Ramos PS, Silver RM, Feghali-Bostwick CA. Genetics of systemic sclerosis: recent advances. *Curr Opin Rheumatol.* 1º de novembro de 2015;27(6):521.
 22. Mak ACY, Tang PLF, Cleveland C, Smith MH, Kari Connolly M, Katsumoto TR, et al. Whole Exome Sequencing for Identification of Potential Causal Variants for Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 1º de setembro de 2016;68(9):2257.
 23. Juhl P, Bondesen S, Hawkins CL, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Davies MJ, et al. Dermal fibroblasts have different extracellular matrix profiles induced by TGF- β , PDGF and IL-6 in a model for skin fibrosis. *Sci Rep.* 1º de dezembro de 2020;10(1).
 24. Vallée A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallée JN, Vallée A, Lecarpentier Y, et al. Interactions between TGF- β 2, canonical WNT- β -catenin pathway and PPAR β ; in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget.* 23 de setembro de 2017;8(52):90579–604.
 25. Nihtyanova SI, Schreiber BE, Ong VH, Rosenberg D, Moinzadeh P, Coghlan JG, et al. Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatology.* 2014;66(6):1625–35.
 26. Ungerer RG, Tashkin DP, Furst D, Clements PJ, Gong H, Bein M, et al. Prevalence and clinical correlates of pulmonary arterial hypertension in progressive systemic sclerosis. *Am J Med.* 1º de julho de 1983;75(1):65–74.
 27. Hachulla E, Launay D, Mouthon L, Sitbon O, Berezne A, Guillevin L, et al. Is pulmonary arterial hypertension really a late complication of systemic sclerosis? *Chest.* 1º de novembro de 2009;136(5):1211–9.
 28. Khanna D, Nagaraja V, Tseng C hong, Abtin F, Suh R, Kim G, et al. Predictors of lung function decline in scleroderma-related interstitial lung disease based on high-resolution computed tomography: Implications for cohort enrichment in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease trials. *Arthritis Res Ther.* 23 de dezembro de 2015;17(1):1–10.
 29. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *The Lancet.* 7 de outubro de 2017;390(10103):1685–99.
 30. YAMAMOTO T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2010;37(1):26–41.

31. MICHAELIS T et al. Avaliação da capilaroscopia usando Endotelina-1 como um marcador de ativação endotelial na lesão microvascular e úlceras cutâneas. *Rev Col Bras Cir.* 2012;39(2):126–32.
32. MORAIS J et al. Influence of alpha2 of the collagen V overexpresssion in physiopathology of fibrosis in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2014;32(2):66–7.
33. Morais J, Martin P, Velosa A, Andrade P, Cruz I, Miracca E et al. Influence of alpha2 of the collagen V overexpresssion in physiopathology of fibrosis in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2014;
34. Denton CP, Wells AU, Coghlan JG. Major lung complications of systemic sclerosis. Vol. 14, *Nature Reviews Rheumatology.* Nature Publishing Group; 2018. p. 511–27.
35. Yue X, Yu X, Petersen F, Riemekasten G. Recent advances in mouse models for systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 1º de dezembro de 2018;17(12):1225–34.
36. Mirsaeidi M, Barletta P, Glassberg MK. Systemic Sclerosis Associated Interstitial Lung Disease: New Directions in Disease Management. Vol. 6, *Frontiers in Medicine.* Frontiers Media S.A.; 2019. p. 248.
37. 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. *J Invest Dermatol.* 1999;112(4):456–62.
38. Morales-Cárdenas A, Pérez-Madrid C, Arias L, Ojeda P, Mahecha MP, Rojas-Villarraga A, et al. Pulmonary involvement in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 1º de novembro de 2016;15(11):1094–108.
39. Stawski L, Han R, Bujor AM, Trojanowska M. Angiotensin II induces skin fibrosis: a novel mouse model of dermal fibrosis. *Arthritis Res Ther.* 22 de agosto de 2012;14(4).
40. 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.* novembro de 2011;63(11):3575–85.
41. Chatterjee S, Mark M, Wooley P, Lawrence D, Mayes M. Increased dermal elastic fibers in the tight skin mouse - PubMed [Internet]. [citado 22 de julho de 2024]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15485016/>
42. 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.
43. Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujii K, Manabe I, et al. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun.* 2014;5.
44. Maurer B, Distler JHW, Distler O. The Fra-2 transgenic mouse model of systemic sclerosis. *Vascul Pharmacol.* 1º de março de 2013;58(3):194–201.
45. 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.
46. Teodoro WR, Witzel SS, Velosa APP, Shimokomaki M, Abrahamsohn PA ZT. Increase of interstitial collagen in the mouse endometrium during decidualization. *Connect Tissue Res.* 2003;44(2):96–103.
47. Teodoro WR, de Jesus Queiroz ZA, Dos Santos LA, Catanozi S, Dos Santos Filho

- A, Bueno C, Vendramini MBG, Fernezlian SM, Eher EM, Sampaio-Barros PD, Pasoto SG, Lopes FDTQS, Velosa APP, Capelozzi VL. 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 Dec 11;21(1):278.
48. 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.
 49. 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.
 50. 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).
 51. de Oliveira CC, Velosa APP, Parra ER, Capelozzi VL, Teodoro WR YNH. Histomorphometric analysis of cutaneous remodeling in the early stage of the scleroderma model. *Clinics*. 2009;64(6).
 52. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 28 de novembro de 2003;55(12):1531–46.
 53. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. Vol. 20, *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier; 2008. p. 495–501.
 54. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. janeiro de 2011;3(1):1–19.
 55. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*. 2001;32(3).
 56. 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. *J Invest Dermatol*. 2012;132(7).
 57. 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.
 58. 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.
 59. Yamada Y, Sekine Y, Yoshida S, Yasufuku K, Petrache I, Benson HL, Brand DD, Yoshino I WDS. Type V collagen-induced oral tolerance plus low-dose cyclosporine prevents rejection of MHC class I and II incompatible lung allografts. *J Immunol*. 2009;183(1):237–45.
 60. Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, Smith J, Cummings OW, Foresman BH, et al. Oral Tolerance Induction by Type V Collagen Downregulates Lung Allograft Rejection. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.2514431>. 14 de dezembro de 2012;25(1):26–34.
 61. 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.
 62. Miller EJ KRR. Preparation and Characterization of the Different Types of Collagen. *Methods Enzymol*. 1982;82(C):33–64.

63. Marangoni RG, Varga J TWG. Animal models of scleroderma: Recent progress. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(6):561–700.
64. 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. *PLoS One*. 21 de outubro de 2013;8(10):e76451–e76451.
65. 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*. 1º de maio de 2015;45(5):1393–402.
66. Ugolini-Lopes MR, Mantovani E, Bonoldi VLN, de Medeiros Ribeiro AC, Bonfá E, Yoshinari N, et al. Anti-collagen type v: a marker of early systemic sclerosis? *Advances in Rheumatology*. 29 de julho de 2019;59(1):19.
67. 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*. 12 de fevereiro de 2021;11.
68. Marangoni RG, Varga J TWG. Animal models of scleroderma: Recent progress. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(6):561–700.
69. 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.
70. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *outubro de 1988* ;96(10):857–81.
71. Jimenez SA. Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis. *ISRN Rheumatol*. 23 de setembro de 2013;2013:1–15.
72. Distler O, Distler JHW, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res*. 9 de julho de 2004;95(1):109–16.
73. Pillai S. T and B lymphocytes in fibrosis and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 1º de novembro de 2019;31(6):576–81.
74. Fuschiotti P. T cells and cytokines in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 1º de novembro de 2018;30(6):594–9.
75. Rosendahl AH, Schönborn K, Krieg T. Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Kaohsiung J Med Sci*. 1º de março de 2022;38(3):187–95.
76. Mouawad JE, Feghali-Bostwick C. The Molecular Mechanisms of Systemic Sclerosis-Associated Lung Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 1º de fevereiro de 2023;24(3).
77. 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(AUG).
78. 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*. novembro de 2011;63(11):3575–85.
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.* 11 de dezembro de 2019;21(1):1–12.
80. 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.* 3 de julho de 2006;298(2):51–7.
 81. Parra ER, Aguiar AC, Teodoro WR, de Souza R, Yoshinari NH CVLC. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clinical Respiratory Journal.* 2009;3(3):135–42.
 82. Parra ER, Teodoro WR, de Moraes J, Katayama MLH, de Souza R, Yoshinari NH et al. I. Increased mRNA expression of collagen v gene in pulmonary fibrosis of systemic sclerosis. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(2):110–20.
 83. Martin P, Teodoro WR, Velosa APP, de Moraes 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.
 84. Velosa APP, Teodoro WR, Dos Anjos DM, Konno R, Oliveira CC, Katayama MLH, Parra ER, Capelozzi VL YNH. Collagen V-induced nasal tolerance downregulates pulmonary collagen mRNA gene and TGF-beta expression in experimental systemic sclerosis. *Respir Res.* 2010;11:1–10.
 85. Adachi E, Hayashi T. In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect Tissue Res.* 1986;14(4):257–66.
 86. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol.* 1988;106(3):999–1008.
 87. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ LT. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci.* 1990;95(4).
 88. Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K, Arima M. Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. *Am J Pathol.* 1984;116(3):417.
 89. Adachi E, Hayashi T, Hashimoto PH. A comparison of the immunofluorescent localization of collagen types I, III, and V with the distribution of reticular fibers on the same liver sections of the snow monkey (*Macaca fuscata*). *Cell Tissue Res.* abril de 1991;264(1):1–8.
 90. Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessier LI, et al. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol.* 1993;121(5):1181–9.
 91. Liu X, Keene DR, Jaenisch R, Ramirez F. Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. *Nat Genet.* 1995;9(1):31–6.
 92. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 28 de novembro de 2003;55(12):1531–46.
 93. 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.* julho de 2004;24(13):6049.
 94. Germana Z, Simona G, Marialucia L, Biagina M, Christine V, Paola F, et al.

- Hypoxia-induced miR-210 modulates the inflammatory response and fibrosis upon acute ischemia. *Cell Death & Disease* 2021 12:5. 1º de maio de 2021;12(5):1–14.
95. Ilieş RF, Aioanei CS, Cătană A, Halmagyi SR, Lukacs I, Tokes RE, et al. Involvement of COL5A2 and TGF- β 1 in pathological scarring. *Exp Ther Med*. 27 de julho de 2021;22(4).