Jymenez de Moraes

**Análise ultraestrutural e implicação do RNA de
interferência na fibrilogênese do colágeno V em pacientes
com esclerodermia**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos
Orientadora: Profa. Dra. Walcy Paganelli
Rosolia Teodoro

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Morais, Jymenez de

Análise ultraestrutural e implicação do RNA de interferência na fibrilogênese do colágeno V em pacientes com esclerodermia / Jymenez de Moraes. São Paulo, 2014.

Tese (doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos.

Orientadora: Walcy Paganelli Rosolia Teodoro.

Descritores: 1.Pele/ultraestrutura 2.Colágeno/ultraestrutura
3.Colágeno/biossíntese 4.Colágeno tipo V 5.Esclerodermia 6.Fibrose

USP/FM/DBD-318/14

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram conquistadas
do que parecia impossível”.*

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente em horas de angústia e a Nossa Senhora de Aparecida, mãe, que sempre esteve a minha frente guiando-me nesta caminhada.

Aos meus pais, Hamilton e Sueli, a quem devo tudo que sou, dedico este trabalho e agradeço por toda ajuda companheirismo, amor e por terem me ensinado o verdadeiro valor e sentido da vida, sendo meus primeiros mestres.

Ao meu amado filho João Pedro; é por ele quem sempre me manteve firme nesta luta. A minha irmã Suzana, por sua amizade e cumplicidade.

Não poderia deixar de agradecer à Priscila Andrade, peça fundamental na conclusão deste trabalho. Agradeço por sempre estar ao meu lado e por todo o suporte que sempre me ofereceu tão prontamente.

Em especial, dedico este trabalho a minha orientadora Dra. Walcy, quem me acolheu em seu laboratório, nunca poupou esforços para me ensinar e orientar, e apesar de tantos altos e baixos encontrados nesta caminhada, nunca desistiu. Agradeço a Deus por tê-la colocado no meu caminho.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Virgem Maria pelo dom da vida e principalmente pelas oportunidades e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

Mais do que a qualquer outra pessoa, à minha querida orientadora, Profa. Dra. Walcy Rosolia Teodoro, merece o meu primeiro agradecimento, por sempre ter demonstrado acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação, pela coragem de ousar trabalhar com novas ideias e conceitos, por ouvir com interesse todas as minhas questões, dúvidas e problemas, pela confiança e sinceridade, por nunca ter desistido deste projeto e, sem esquecer também, por todo o apoio e amizade estabelecida neste tempo.

À doce Dra Ana Paula Pereira Velosa, por ter transmitido seus conhecimentos com paciência e serenidade, por sua disposição de sempre me auxiliar prontamente na padronização e realização das metodologias utilizadas neste trabalho e, principalmente, pela sua humildade, lição que ensinou sem palavras, mas com seu exemplo, e que levarei comigo para o resto de minha vida.

À Profa. Dra Vera Luiza Capelozzi, por seus ensinamentos de patologia, por sua disponibilidade e por suas palavras de incentivo.

Ao Dr. Edwin Roger Parra, sempre presente, pela sua amizade e por seu auxílio na aquisição e interpretação dos dados deste trabalho.

À Prof. Dra Eloisa Bonfá, pela oportunidade dentro da Disciplina de Reumatologia da FMUSP no curso de pós-graduação.

À Profa. Telma Tenório Zorm e a querida Fernanda por ter me aberto às portas do seu laboratório e ter me ajudado na padronização da técnica de Microscopia eletrônica.

À Isabele Brindo da Cruz por toda a ajuda que me deu em todos os momentos que precisei e principalmente pela amizade construída.

À Solange Carrasco, por ter me ensinado a cultivar fibroblastos e por ter se tornado uma grande amiga.

À minha querida amiga Patrícia Martin pela amizade por mesmo estado tão longe estive tão perto.

Às amigas de laboratório Natália Borsonello, Silvana Atayde, Maristela Rangel, Vanessa Carioca, Natália Colombo, Sandra Atayde pelo companheirismo e pela ajuda em vários procedimentos laboratoriais.

À minha querida amiga e Priscila Andrade por todo tempo disponível e dedicado a me ajudar, além de ter se transformado em uma pessoa importante em minha vida com sua amizade.

À Dra Ana Garipo, pela aquisição das imagens no microscópio confocal e pelo carinho com que sempre me recebia.

À Mirim Regina P. T. Simone, Maria Cecília S. L. Marcondes, Adão Caetano Sobrinho e Maria Margarida T. Monteiro do Laboratório de Biologia Celular no setor de Microscopia Eletrônica, por todo ensinamento sobre microscopia eletrônica.

À Denise Frediani, pelo seu tempo dedicado a me ajudar e pelo capricho com que sempre realiza seu trabalho.

À Renata, que me ajudou com carinho na padronização das proteínas.

À Sofia, que tanto me ajudou mesmo de tão longe.

Às meninas tão queridas, Maria Aparecida A. Ferraz, Juraci Pereira, Vilma Alves e Ângela Maria de Souza por toda ajuda.

Às queridas amigas Flávia, Daliane, Natália, Ana Cláudia, Isis e Claudinha, que acompanharam na luta para este título.

Ao meu querido Adalberto, sempre tão compreensivo e atencioso.

À Adriana Antonaccio e Karina Balhes, por sua compreensão e ajuda no término deste trabalho.

À todos os que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Anticorpo Anticentrômero
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AECA	Anticorpo anti-célula endotelial
Anti-Sc170	Antitopoisomerase 1
BSA	Soro de albumina bovina
CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCL	Quimiocina
cDNA	DNA Complementar
CMV	Citomegalovírus
COLV	Colágeno tipo V
COL5A1	Gene do colágeno tipo V cadeia alfa 1
COL5A2	Gene do colágeno tipo V cadeia alfa 2
COL5A3	Gene do colágeno tipo V cadeia alfa 3
COOH	Região carboxiterminal
CPU	Capilaroscopia Periungueal
CTGF	Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenycinodole
DMEM	Meio de Dulbeco modificado por Eagle
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Bar
ES	Esclerose Sistêmica
ET	Endotelina
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFN	Interferon
IL	Interleucina
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade

MMPs	Metaloproteinases
NH ₂	Região amino terminal
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA Mensageiro
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação de Cadeia em polimerase
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDGFR	Receptor de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGE	Prostaglandina
PGI	Prostaciclina
RGD	Arginina-Glycina-Aspartato
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
SD	Escleroderma
SFB	Soro Fetal Bovino
SRE	Elemento de resposta a soro
TBS	Tampão Salino Tris
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TGF-βR	Receptor de Fator de Crescimento Transformador Beta
Th	Células T helper
Treg	Células T regulatórias
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
mm	Milímetro
mM	Mili molar
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
μl	Microlitro
α ₁	Cadeia alfa 1
α ₂	Cadeia alfa 2
ζ	Gama

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo dos fatores etiológicos e da patogênese da ES	5
Figura 2. Lesões em diferentes estágios de esclerodermia	7
Figura 3. Padrões na imunofluorescência de anticorpos antinucleares	9
Figura 4. Proposta dos mecanismos patogênicos envolvidos na ES	12
Figura 5. Células precursoras de miofibroblastos	14
Figura 6. Visão geral dos fatores envolvidos na programação pró-fibrótica de miofibroblastos e fibroblastos	16
Figura 7. Ativação do fibroblasto na Escleroderma	16
Figura 8. Esquema ilustrativo da hélice tripla do colágeno	19
Figura 9. Estruturas supramoleculares formadas por colágenos	20
Figura 10. Diagrama esquemático da biossíntese dos colágenos fibrilares	21
Figura 11. Ilustração da pele humana normal	23
Figura 12. Desenho esquemático da interação dos colágenos I, III e V na formação da fibra heterotípicas	25
Figura 13. Representação da localização dos genes COL5A1 e COL5A2	27
Figura 14. Estrutura do Colágeno tipo V	28
Figura 15. Desenho esquemático da interação dos colágenos I e V nas fibrilas heterotípicas	30
Figura 16. Diagnóstico histológico da ES e pele controle	36
Figura 17. Ilustração representativa da avaliação das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ da derme papilar por análise de imagem	39
Figura 18. Ilustração representativa da avaliação das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ da derme reticular por análise de imagem	39
Figura 19. Ilustração representativa da análise as cadeias $\alpha_1(V)$ e $\alpha_2(V)$ dos vasos da pele por análise de imagem	40
Figura 20. Identificação dos fibroblastos	43

Figura 21. Fibroblastos transfectados com a sequência de siRNA contra o gene COL5A2	45
Figura 22. Imagem ilustrativa do produto de PCR após reação de qRT-PCR em gel de agarose 2%	47
Figura 23. Estruturas microscópicas da pele dos controles e de pacientes com ES, coradas com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson.....	52
Figura 24. Reconstrução 3D da imunomarcção da cadeia $\alpha 1(V)$ na derme papilar e reticular de controles e pacientes com ES.....	55
Figura 25. Reconstrução 3D da imunomarcção da cadeia $\alpha 2(V)$ na derme papilar e reticular de controles e pacientes com ES.....	56
Figura 26. Reconstrução 3D da imunomarcção dupla em microscópio confocal das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, das peles controle e de pacientes com ES.....	57
Figura 27. Micrografias eletrônicas de pele humana.....	61
Figura 28. Micrografias eletrônicas de pele humana.....	62
Figura 29. Micrografias eletrônicas de pele humana.....	63
Figura 30. Micrografias eletrônicas de pele humana.....	64
Figura 31. Imunomarcção de fibroblasto de pele de controle e paciente com ES.....	66
Figura 32. <i>Immunoblot</i> das cadeias $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ e β -actina isolado da extração protéica de fibroblastos dérmicos de pacientes e controles	66
Figura 33. Inibição do gene COL5A2 em fibroblasto de pele de pacientes com ES....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características encontradas nas formas limitada e difusa de ES.....	2
Tabela 2. Índice de atividade de Valentini	35
Tabela 3. Sequência de Oligonucleotídeos	46
Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes.....	50
Tabela 5. Quantificação da expressão das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno V na pele dos grupos controle e pacientes com ES.....	58
Tabela 6. Quantidade relativa da expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1 de fibroblastos da pele dos grupos controle e pacientes com ES por qRT-PCR	67
Tabela 7. Quantidade relativa da expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1 após inibição do COL5A2 em fibroblastos de pacientes com ES por qRT-PCR.....	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Expressão da cadeia $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V na derme papilar do grupo controle e pacientes com ES em porcentagem.....	58
Gráfico 2. Expressão da cadeia $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V na derme reticular do grupo controle e pacientes com ES em porcentagem.....	59
Gráfico 3. Expressão da cadeia $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V nos capilares da pele do grupo controle e pacientes com ES em porcentagem.....	59
Gráfico 4. Expressão da cadeia $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V nos vasos da pele do grupo controle e pacientes com ES em porcentagem.....	59
Gráfico 5. Quantidade relativa da expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1 de fibroblastos da pele dos grupos controle e pacientes com ES por qRT-PCR	68
Gráfico 6. Quantidade relativa da expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1 após inibição do COL5A2 em fibroblastos de pacientes com ES por qRT-PCR.....	73

RESUMO

Morais J. *Análise ultraestrutural e implicação do RNA de interferência na fibrilogênese do colágeno V em pacientes com esclerodermia*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Recentemente muitas são as funções atribuídas ao colágeno V em condições fisiológicas normais e em algumas doenças, como na esclerodermia. Esta proteína apresenta características estruturais singulares de regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas, e imunogenicidade, sendo capaz de desencadear uma resposta imune independente. Em descobertas recentes, desenvolvidas por nosso grupo, ficou evidenciado que o colágeno V apresenta histoarquitetura anômala, aumentando a sua imunoe expressão na pele e pulmão em estágios iniciais da doença, assim como, aumento do RNAm de suas cadeias, principalmente $\alpha 2(V)$. Por esta razão e com o intuito de entender sobre os processos moleculares e ultraestruturais que correlacionam o COL V à fibrose na ES, a proposta do presente estudo foi realizar análise morfológica e ultraestrutural das cadeias, $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, da pele de pacientes com ES, assim como avaliar a influência do gene COL5A2 na fibrilogênese. **Pacientes e Métodos:** As análises foram desenvolvidas utilizando fragmento de pele obtidas de biópsia, tanto de pacientes como controles, sob aprovação do comitê de ética (CAPPesq 0331/10) e de acordo com Declaração de Helsinque. Participaram do estudo 7 pacientes (homens=3, mulheres=4) diagnosticados com ES há dois anos ou menos, e indivíduos voluntários saudáveis (n=7) utilizados como grupo controle. A biópsia das peles foi dividida para dois grupos de análises: estudos histológicos e cultura de fibroblastos; sob solução de formol a 10%, foram realizadas análises histomorfométricas [coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E), Tricrômico de Masson, imunofluorescência (IM) para cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, e reconstrução tridimensional (Zeiss LSM 510 META/UV)], e em solução de glutaraldeído 2% para análise ultraestrutural (microscopia eletrônica de transmissão com imunomarcção com ouro coloidal). A quantificação das cadeias foi realizada por histomorfometria, através de análise de imagem utilizando o *software Image Pro-Plus 6.0*. Já a cultura de fibroblastos foi desenvolvida para avaliar: distribuição e perfil das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ [reconstrução 3D (Zeiss LSM 510 META/UV)], expressão gênica COL5A1, COL5A2 e ITGA2 [*qRT-PCR* (Applied Biosystems)], e inibição temporária do gene COL5A2. **Resultados:** Na análise morfológica (H&E e Masson) observou-se modificação da histoarquitetura da pele dos pacientes, com espessamento e retificação da epiderme devido ao aumento na densidade das fibras colágenas, com projeções das papilas dérmicas em direção à derme papilar. Esse resultado foi confirmado na quantificação das cadeias (IM), evidenciado por perda acentuada da cadeia $\alpha 1(V)$ na derme papilar [$12,77 \pm 1,344$ vs $66,84 \pm 3,36$ ($p < 0,0001$)] e aumento significativo da expressão da cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ na derme reticular $\alpha 1(V)$ [$7,657 \pm 0,2133$ vs $13,75 \pm 0,958$ ($p < 0,0001$)] e $\alpha 2(V)$ [$5,072 \pm 0,4117$ vs $21,07 \pm 0,790$ ($p=0,001$)] dos pacientes quando comparados ao controle. Assim como visto na imunomarcção com ouro coloidal das cadeias do COLV, houve ausência de expressão linear da cadeia $\alpha 1(V)$ na derme papilar, contrastando com a expressão da mesma na pele de controles, se contrapondo a forte imunoe expressão das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ com uma maior evidência da cadeia $\alpha 2(V)$ na região espessada pela junção lâmina basal e derme reticular. A reconstrução 3D em cultura de fibroblastos dérmicos demonstrou

grande atividade das células de pacientes com ES, confirmado na expressão gênica dos COL5A1, COL5A2 e ITGA2, que se mostraram aumentados significativamente nos pacientes em relação ao controle. Por fim, após inibição do COL5A2 houve uma tendência ao aumento na expressão do COL5A1, e superexpressão da ITGA2. **Conclusão:** A alteração dérmica observada em pacientes com ES esta correlacionada com a modificação na distribuição das cadeias alfas do COLV, principalmente por perda acentuada da $\alpha 1(V)_3$ homotrímera na derme papilar e superexpressão da $\alpha 2(V)$ em capilares e vasos, interferindo na formação de matriz extracelular normal, sugerindo uma alteração pós traducional desta proteína, e que maiores estudos sobre a inibição da cadeia $\alpha 2(V)$ são importantes para uma futura terapia gênica para atenuar os sintomas desencadeados nesta patologia.

Descritores: 1.Pele/ultraestrutura 2.Colágeno/ultraestrutura 3.Colágeno/biossíntese 4.Colágeno tipo V 5.Esclerodermia 6.Fibrose

SUMMARY

Morais J. *Ultrastructural analysis and implication of RNA interference in collagen V fibrillogenesis in patients with scleroderma*. [Thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; In 2014.

Introduction: Recently many functions are attributed to type V collagen in normal physiological conditions and in some diseases, such as scleroderma. This protein presents unique structural features for regulating the diameter of fibrils heterotypic and immunogenicity being capable of eliciting an immune response independent. In recent discoveries, developed by our group, it was evident that collagen V presents anomalous histoarchitecture, increasing the immunoexpression in the skin and lung in the early stages of the disease, as well as increased mRNA of his chains, mainly $\alpha 2(V)$. For this reason and in order to understand the molecular and ultrastructural processes that correlate COL V fibrosis in SSc, the purpose of this study was to perform morphological and ultrastructural analysis of the chains $\alpha 1(V)$ and $\alpha 2(V)$ of the patient's skin with ES, as well as to assess the influence of the COL5A2 gene in fibrillogenesis. **Patients and Methods:** The analyses were developed using skin fragment obtained from biopsy, both of patients and controls, under the approval of the ethics committee (CAPPesq 0331/10) and in accordance with the Declaration of Helsinki. The study included 7 patients (male = 3, female = 4) diagnosed with ES for two years or less, and healthy volunteers (n = 7) used as a control group. The biopsy of the skin was divided in two groups of analyzes: histological studies and cultured fibroblasts; Under formaldehyde solution 10%, histomorphometric analysis [staining with hematoxylin and eosin (H&E), Masson's trichrome, immunofluorescence (IM) to $\alpha 1(V)$ and $\alpha 2(V)$ chains, and three-dimensional reconstruction (Zeiss LSM 510 META were performed/UV), and in a solution of 2% glutaraldehyde for ultrastructural analysis (transmission electron microscopy with immunostaining with colloidal gold). Quantitation was performed by the chain histomorphometry by image analysis using Image Pro-Plus 6.0 software. Already a fibroblast culture was developed to assess: distribution and profile of the $\alpha 1(V)$ and $\alpha 2(V)$ chains, 3D reconstruction (Zeiss LSM 510 META / UV), gene expression of COL5A1, COL5A2 and ITGA2 [RT-qPCR (Applied Biosystems)], and temporary inhibition of the COL5A2 gene. **Results:** In the morphological analysis (H&E and Masson) was observed modification of histoarchitecture patient's skin, with thickening and rectification of the epidermis due to increased density of collagen fibers, with projections of dermal papillae toward the papillary dermis. This result was confirmed by quantification of the chains (IM), evidenced by marked loss of the $\alpha 1(V)$ chain in the papillary dermis [12.77 ± 1.344 vs 66.84 ± 3.36 ($p < 0.0001$)] and significant increase in the expression of $\alpha 1(V)$ and $\alpha 2(V)$ chains, in the reticular dermis $\alpha 1(V)$ chain [0.2133 ± 7.657 vs 0.958 ± 13.75 ($p < 0.0001$)] $\alpha 2(V)$ chain [5.072 ± 0.4117 vs 21.07 ± 0.790 ($p = 0.001$)] of patients when compared to control. As seen in the immunostaining with colloidal gold chains of COLV, there was no linear expression of the $\alpha 1(V)$ chain in the papillary dermis, contrasting with the same expression on the skin of controls, in contrast to strong immunoexpression of $\alpha 1(V)$ and $\alpha 2(V)$ chains, with a higher evidence of $\alpha 2(V)$ chain in the junction region by a thickened basement membrane and reticular dermis. The 3D reconstruction of dermal fibroblasts in culture demonstrated large cell activity of

patients with SSc, confirmed the gene expression of COL5A1, COL5A2 and ITGA2, which showed significantly increased in patients compared to control. Finally, after inhibition of COL5A2 there was a trend to increase in the expression of the COL5A1, and overexpression of ITGA2. **Conclusion:** The dermal alteration observed in SSc patients is correlated with the change in the distribution of the collagen alpha (V) chains, mainly by marked loss of $\alpha 1(V)_3$ homotrimer the papillary dermis and overexpression of the $\alpha 2(V)$ in capillaries and vessels, interfering with the normal extracellular matrix formation, suggesting a post-translational modification of this protein, and further studies on the inhibition of chain $\alpha 2(V)$ are important for future gene therapy to attenuate the symptoms of this pathology triggered.

Descriptors: 1.Skin/ultrastructure 2.Collagen/ultrastructure 3.Collagen/biosynthesis
4. Type V collagen 5.Scleroderma 6. Fibrosis

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e unidades.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Gráficos.....	vi
Resumo.....	vii
Summary.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Conceitos gerais da esclerose sistêmica	1
1.2 Patogênese da esclerose sistêmica	4
1.3 Mecanismo de sinalização do fibroblasto na ES	13
1.4 Colágeno	18
2. OBJETIVO	33
3. PACIENTES E MÉTODOS	34
3.1. Pacientes	34
3.2. Imunofluorescência	37
3.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	40
3.4. Cultura de células	42
3.5. Supressão temporária da expressão do gene COL5A2	44
3.6. Extração proteica da cultura de fibroblastos	48
3.7. Análise estatística	49
4. RESULTADOS	50
4.1 Caracterização dos pacientes e controles.....	50
4.2 Remodelamento da pele na esclerodermia.....	51
4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	60
4.4 Reconstrução tridimensional 3D em fibroblasto de pele.....	65
4.5 Expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1	67
4.6. Immunoblot das cadeias $\alpha 1(v)$ e $\alpha 2(v)$ extraídas de fibroblastos de pele	69
4.7. Inibição do COL5A2	69

5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO	77
7. ANEXO	78
7.1. Aprovação da CAPPesq 0331/10	78
7.2. Aprovação da CAPPesq 0817/17	78
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONCEITOS GERAIS DA ESCLEROSE SISTÊMICA

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença crônica do tecido conjuntivo de etiologia desconhecida, caracterizada pela ativação do sistema imune e que resulta em distúrbios vasculares e fibrose acentuada na pele e órgãos internos, principalmente no pulmão, coração, esôfago e rins.^{1,2}

Apesar de ser considerada uma doença rara, com incidência de 0.3-2.8/100mil/ano e uma prevalência de 1-15/100 mil habitantes, ela tem sido alvo de diversos estudos por apresentar índice de mortalidade elevado, comprometimento da qualidade de vida, desenvolvimento incapacitante e pior prognóstico, quando comparada a outras doenças reumáticas. A variação nos índices de prevalência está associada à localização geográfica e à etnia. Em termos de localidade, há maior incidência da doença na América do Norte, em comparação com a Europa e o Japão. No que diz respeito à etnia e ao sexo, ela é mais comum em negros e mulheres, apresentando em média uma relação de 3/1, sendo que nas mulheres, o maior acometimento pode ser atribuído à variação hormonal.³

Outro fator que impulsiona o interesse em novas pesquisas está relacionado ao elevado custo econômico dispendido com tal patologia, por seu caráter progressivo e incapacitante. O índice de mortalidade desta doença varia muito, dependendo do grupo de pacientes analisados e do tipo de órgão envolvido, registrando-se sobrevida de 5 anos, em 85% dos casos, e de 10 anos, em 70% deles.^{3,4,5}

Na América do Sul, estudos relacionados a custos, incidência e prevalência da ES são muito escassos, contando somente com uma pesquisa na Argentina, sobre prevalência, que mostrou resultados semelhantes aos da América do Norte (29,6/100 mil habitantes); no Brasil, não temos dados disponíveis nesses aspectos.^{4,5}

Segundo o Colégio Americano de Reumatologia (ACR),⁶ a ES é classificada em dois subtipos, difusa e limitada, ambos baseados na extensão do envolvimento cutâneo (Tabela 1).^{3-5,7,8}

Tabela 1. Principais características encontradas nas formas limitada e difusa de ES. ⁹

Características	ES limitada	ES difusa
Fenômeno de Raynaud	Aparece anos (décadas) antes das outras manifestações	Entre o seu aparecimento e o de outras manifestações da ES, passa-se, habitualmente, menos de um ano
Telangiectasias	Frequentes	Podem surgir em fases avançadas da doença
Calcificações subcutâneas	Frequentes	Podem surgir em fases avançadas da doença
Atritos tendinosos	Raros	Frequentes
Envolvimento de órgãos internos	Ocorre tardiamente e com menor frequência que na forma difusa	Ocorre mais precocemente e com maior frequência que na forma limitada
Marcadores sorológicos	Anticentrômero (70%-80%)	AntiScl-70 (até 30% dos casos)
Capilaroscopia ungueal	Dilatação dos capilares, sendo pouco frequente a perda de alças capilares	Perda de alças capilares
Principal causa de morte	Hipertensão pulmonar	Alveolite fibrosante

A fibrose cutânea, manifestação precoce e mais comum da ES, tem sido o principal fator do diagnóstico e dos critérios de classificação dessa enfermidade. ⁹ Pacientes com doença difusa apresentam espessamento da pele da face, tronco, abdome e porção proximal dos membros. Nesses pacientes, a evolução da patologia é rápida e, além do acometimento cutâneo, causa doença pulmonar intersticial, havendo risco aumentado de crise renal esclerodérmica. Além disso, nessa forma de ES, é comum a presença de anticorpos antitopoisomerase. ^{1,9}

Na forma limitada, o espessamento cutâneo geralmente se restringe às mãos e face, podendo envolver a pele distal dos cotovelos e joelhos. Nos pacientes com essa patologia, são comuns manifestações como telangiectasias, calcinose e hipertensão pulmonar, assim como a presença de anticorpos anticentrômeros. Nas duas formas da

doença, pode ocorrer envolvimento do trato gastrointestinal, sendo a dismotilidade esofágica a manifestação mais comum.^{1,9}

Embora apresentem alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, esses critérios não detectam adequadamente pacientes com doença inicial. Nesse sentido, LeRoy, em 1996, propôs critérios para o diagnóstico de formas iniciais de ES:¹⁰

- Evidência objetiva (observada pelo médico) do fenômeno de Raynaud mais padrão SD (*scleroderma*) na capilaroscopia periungueal (CPU) ou autoanticorpos específicos para ES; ou
- Evidência subjetiva (na anamnese) de fenômeno de Raynaud mais padrão SD na CPU e autoanticorpos específicos para ES.¹⁰

Além desses, outros critérios também estão sendo estudados para se classificar à forma inicial da ES, como exames laboratoriais e de imagem, mas eles ainda não são validados na prática clínica.¹¹

O fenômeno de Raynaud destaca-se por estar presente tanto na forma limitada como na difusa. Trata-se da manifestação clínica mais precoce da ES, precedendo o espessamento cutâneo por anos, na forma limitada, e por menor intervalo de tempo, na forma difusa, denotando a importância da vasculopatia como evento inicial na patogênese da doença.¹²

A extensão do acometimento cutâneo parece ser um fator prognóstico, já que estudos recentes mostraram que a doença difusa é predito independente de menor sobrevida.¹³⁻¹⁵ Além disso, a maior morbidade está associada à extensão do espessamento cutâneo, uma vez que é possível observar melhora da função nas mãos, quando existe amolecimento da pele, após tratamento ou evolução natural da enfermidade.¹⁵⁻¹⁷

Apesar da etiologia desconhecida, é consenso na literatura que a ES está associada a fatores ambientais e genéticos.¹⁸ Dentre esses componentes, o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) mostrou-se relevante nessa doença, sugerindo que esses genes possam ter uma relação com a frequência de autoanticorpos.^{19,20} Os haplótipos HLADRB1*01 - DQB1*0501 são mais comuns em pacientes com anticorpo anticentrômero (ACA) positivo, enquanto os haplótipos HLADRB1*11 - DQB1*0301 têm sido associados com anticorpo antitopoisomerase I (anti-topo I).¹⁹⁻²¹

Pelo caráter genético da doença, o histórico familiar também é considerado um fator importante para o acometimento pela ES, aumentando o risco relativo dos que têm

esse histórico, quando comparados com a população normal, corroborando assim o fato de que a carga genética possa ser um fator determinante na etiologia da enfermidade.¹⁸⁻

²¹ Sabe-se que a exposição a agentes químicos como o benzeno, tolueno e silício sustentam a hipótese do desenvolvimento da ES por fatores ambientais. Compõe-se uma tríade etiológica da ES com a participação de agentes infecciosos, tais como: parvovírus B19, citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Bar (EBV) e bactérias.²²⁻²⁴

Alguns autores associam os mecanismos imunopatogênicos a esses agentes no desencadeamento da doença. Dessa forma, foi demonstrado que 57% a 79% dos pacientes com ES apresentam partículas de DNA de parvovírus B19 na medula óssea, que constitui um reservatório a partir do qual esse vírus se espalha para os tecidos periféricos, infectando as células endoteliais.²³⁻²⁵ O grau de expressão de RNA mensageiro (RNAm) de parvovírus B19 nessas células está diretamente relacionado ao grau de injúria endotelial e do infiltrado inflamatório perivascular.^{25,26} Em relação ao CMV, sabe-se que esse vírus é capaz de infectar células endoteliais e macrófagos, levando à produção de citocinas pró-fibróticas e de integrinas.^{27,28} Todos esses fatores associados podem resultar no espessamento cutâneo, uma das principais características da ES.

1.2. PATOGÊNESE DA ESCLEROSE SISTÊMICA

A patogênese da ES é resultante da correlação entre três mecanismos: vasculopatia (desordem vascular endotelial com células adventíciais), disfunção do sistema imunológico (apresentando fenômenos inflamatórios e autoimunes) e depósito excessivo na matriz extracelular (fibras de colágeno, fibroblasto como célula central).^{4,29-32.}

A sequência exata dos acometimentos e o impacto mútuo destes três componentes não foram até o momento totalmente elucidados e muitos mecanismos permanecem desconhecidos. A incidência rara, a heterogeneidade clínica dos resultados e o curso individual da doença dificultam estudos clínicos mais fundamentados. Porém, os dados disponíveis descrevem a patogênese da ES como um evento composto, como exemplificado na **Figura 1**.

Figura 1: Resumo dos fatores etiológicos e da patogênese da ES. **Fonte:** Adaptado de Viswanath, *et al*, 2013.³³

1.2.1. Vasculopatia

As manifestações clínicas vasculares são caracterizadas por telangiectasias, fenômeno de Raynaud, hipertensão arterial pulmonar e crise renal esclerodérmica.³⁴ Outros órgãos frequentemente acometidos na ES, mais associados com o componente fibrótico, são o pulmão e o trato gastrointestinal, órgãos-alvo da doença.³⁵⁻³⁷ As alterações vasculares podem ser detectadas precocemente por meio de capilaroscopia periungueal, redução das alças, dilatação e distorção dos capilares.³⁸

As alterações fisiopatológicas da ES ocorrem de forma desordenada, porém sabe-se que a manifestação clínica mais precoce é o fenômeno de Raynaud, que se refere a uma alteração vascular, caracterizada por um vasoespasmo em resposta à temperatura e ao estresse, a qual pode preceder ou ser concomitante com outras mudanças que caracterizam essa patologia.¹² Os dados clínicos e patológicos sustentam a hipótese de

que a vasculatura possa ser o alvo principal na ES, com angiogênese e vasculogênese alteradas.^{30,31, 39}

A presença de vasculopatia na ES é um aspecto de grande importância na patogênese da doença. Essa disfunção ocorre devido à ativação das células endoteliais, alteração do tônus vascular, progressiva desorganização da arquitetura do vaso e espessamento da camada íntima, resultando na oclusão vascular. Esses eventos podem estar relacionados com a infecção por micro-organismos, substâncias tóxicas ou controle inadequado do fenômeno do estresse oxidativo, promovendo a liberação de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e produção de mediadores vasoativos, que podem aumentar a permeabilidade do vaso e a quimiotaxia de células inflamatórias.⁴⁰⁻⁴²

Muitas evidências patológicas apontam para a lesão endotelial como um processo inicial e principal no desenvolvimento da patogênese da doença.¹⁰ O exame anatomopatológico de biópsias de pele, em fase inicial da ES, revelou alterações compatíveis com células endoteliais lesadas,⁴³ incluindo células endoteliais em apoptose, as quais precedem o desenvolvimento de fibrose por meses a anos.⁴³⁻⁴⁶

Acredita-se que a fase inicial da vasculopatia é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, que permite a infiltração de células mononucleares, resultando em células inflamatórias perivasculares, o que é clinicamente observado como um edema periférico, normalmente nos dedos.^{10,40} Esse quadro edematoso é resultante do estreitamento vascular, gerador de episódios recorrentes de isquemia-reperfusão. Portanto, devido à perda de elasticidade dos vasos, a comunicação na camada adventícia dos vasos torna-se rígida e mais propensa à oclusão das pequenas artérias. Essa oclusão se agrava pela associação de eventos trombóticos de ativação plaquetária, resultando em danos em órgãos terminais.⁴⁰

Apesar do estímulo inicial da ES ainda ser desconhecido, há hipóteses que incluem a participação de agentes infecciosos, tais como CMV, conduzindo ao mimetismo molecular, uma vez que os anticorpos que reconhecem epítomos de CMV têm reação cruzada com as células endoteliais e induzem à apoptose.²⁷ Além disso, os anticorpos anticélula endotelial (AECAs) têm sido implicados na lesão endotelial, embora não esteja claro se eles são o mecanismo primário de lesão da célula endotelial ou uma consequência secundária da lesão da mesma. A prevalência de AECAs nos

pacientes com ES é de 22% a 86%, sendo essa grande variabilidade resultante de diferenças entre populações de pacientes e técnicas de detecção.⁴⁷

O endotélio regula o fluxo normal de sangue e a migração transendotelial dos leucócitos. Também mantém um revestimento antitrombótico, regulando a coagulação e a fibrinólise. A lesão do endotélio leva à super-regulação de moléculas de adesão celular, o que resulta em aumento do tráfego de leucócitos e migração, os quais podem ser responsáveis pelos infiltrados perivascularres vistos na ES.⁴⁷ A produção e a excreção aumentadas de vasoconstritores, como a endotelina-1 (ET-1), e de moléculas que prejudicam os vasodilatadores, tais como óxido nítrico e prostaciclina, também podem contribuir para a instabilidade vascular, como demonstra a **Figura 2**.⁴⁸⁻⁵¹

Figura 2. Lesões em diferentes estágios de esclerodermia. O painel A mostra lesão microvascular, um dos primeiros eventos na patogênese da ES, caracterizada por danos nas células endoteliais, proliferação das camadas de lâmina basal, aprisionamento de células mononucleares de sangue periférico na parede do vaso e infiltração de células mononucleares perivascularres. Células endoteliais mostram sinais de morte celular programada aumentada. Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser o agente desencadeante desta fase. ROS podem ser gerados dentro do lúmen vascular periférico ou dentro da parede do vaso por macrófagos, células endoteliais, células de músculo liso, vascular ou fibroblastos de adventícia, em resposta a agentes nocivos. Baixos níveis de ROS são necessários para a função vascular normal, porém a produção excessiva é responsável por danos funcionais e estruturais, como mostrado no painel B. A produção descontrolada de ROS ativa as células mesenquimais, induzindo à quimiotaxia, proliferação, produção de matriz extracelular e liberação de citocinas e fatores de crescimento, que amplificam o processo inflamatório. Um circuito autócrino mantém o ROS em níveis elevados por causa da rotatividade reduzida de receptores de citocinas. Ocorrem anormalidades estruturais e funcionais das paredes dos vasos e alterações intravasculares, levando a sintomas

clínicos evidentes. Conforme mostrado no painel C, a próxima etapa é dominada por fibrose denotada por desarranjo da arquitetura de órgãos viscerais, rarefação de vasos sanguíneos e, consequentemente, hipóxia, que contribui para a manutenção da fibrose. Conforme mostrado no painel D, uma vez que mecanismos responsáveis pela ativação de células mesenquimais diminuem ou atenuam, elas entram em apoptose. O quadro clínico é dominado por desarranjo de órgãos internos. **Fonte:** Adaptado de Gabrielli *et al*, 2009.⁵¹

A lesão endotelial é evidenciada por meio do aumento do fator de *Von Willebrand*, encontrado no sangue periférico, no qual também são encontrados moléculas de adesão solúveis, trombospondina, trombomodulina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e ativadores de plasminogênio. O aumento na ativação de plaquetas também pode resultar da ativação endotelial na ES, aumentando os agregados plaquetários e de β -tromboglobulina na circulação e, finalmente, em uma angiogênese alterada.^{48-50,52,53}

Muitos autores demonstram uma contribuição negativa de células mononucleares de sangue periférico para a angiogênese na ES.^{45,46,54} Fatores pró-angiogênicos são altamente regulados positivamente, apesar da diminuição da angiogênese.⁵⁵ Esses fatores incluem plaquetas, fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF, VEGF TGF- β , ET-1, e quimiocina CCL2, também conhecida como MCP-1. Potencialmente relevante é o fato de muitas destas citocinas pró-angiogênicas (por exemplo, PDGF, TGF- β , ET-1, CCL2) serem também ativadoras potentes de células da musculatura lisa dos vasos e fibroblastos do estroma, o que indica que elas estão envolvidas na doença vascular proliferativa e fibrose na esclerodermia.^{48,55}

1.2.2 Alterações Imunológicas

Embora a disfunção vascular e a fibrose sejam características clínicas da ES, a reatividade imunológica também é um fator de destaque, contribuindo, provavelmente, para a patogênese da doença.^{12,56} Se o sistema imunológico desempenha um papel fundamental na iniciação e/ou na manutenção da doença, ainda permanece uma questão em aberto. Porém, na derme de pacientes com ES, observa-se um tênue infiltrado de células T, antecedendo a fibrose e resultando em uma resposta imunológica do tipo Th2.⁵⁶⁻⁵⁹ A autoimunidade é caracterizada pela presença de autoanticorpos, como

antitopoisomerase 1 (Scl-70), anticentrômero e anticorpos anti-RNA polimerase III, que identificam subconjuntos clínicos distintos (**Figura 3**).⁵¹

Figura 3. Padrões na imunofluorescência de anticorpos antinucleares. Em A, observa-se a presença de anticorpos antitopoisomerase I, detectados em 30% dos pacientes com esclerodermia difusa. Em B, observa-se um padrão homogêneo nucleolar, que pode ser detectado em 25% a 50% dos pacientes com ES. Os antígenos de nucléolos são RNA polimerases I/II, fibrilarina, Th/To, ou PM-Scl. Em C, nota-se o padrão anticentrômero, detectado em 70% a 80% dos pacientes com esclerodermia cutânea limitada, e que está associado a um alto risco de hipertensão pulmonar. **Fonte:** Adaptado de Gabrielli *et al*, 2009.⁵¹

Recentemente, células T regulatórias (Treg) e células T helper 17 (Th17) têm sido cada vez mais estudadas, devido ao fato de as células Treg suprimirem a reatividade imunológica. Alguns autores sugerem que na ES existe um aumento do número de células Treg alteradas, ao contrário do que acontece em outras doenças autoimunes. As células Th17, por sua vez, apresentam função pró-inflamatória e agem principalmente contra patógenos extracelulares em doenças autoimunes, incluindo a ES.⁶⁰⁻⁶³

Ainda, estudos realizados do genoma dos pacientes portadores de ES relatam uma associação entre ES e polimorfismos no complexo principal de histocompatibilidade de classe II *locus*, a cadeia ζ do receptor de células T, caracterizando uma etiologia imunológica.⁶⁴ No entanto, até a presente data, nenhum modelo animal de ES pôde ser induzido por vacinação com um autoantígeno específico ou por meio de transferência passiva de anticorpos, células B ou células T. Assim, a natureza da relação entre a alteração no sistema imunológico e a patogênese da ES permanece controversa. Por outro lado, a perpetuação do estímulo imunológico

desencadeia um remodelamento da matriz extracelular (MEC) que ativa os fibroblastos a produzir maior quantidade de colágeno.⁶⁵⁻⁶⁸

1.2.3 Alterações na matriz extracelular

A mudança na histoarquitetura da matriz extracelular ocorre principalmente à custa da síntese excessiva do colágeno dos tipos I e III, é progressiva e irreversível, resultando na diminuição e/ou na perda de função dos tecidos envolvidos.⁶⁹⁻⁷¹

Esse remodelamento é resultante do aumento da produção autócrina e parácrina de colágeno ou da interação célula-célula/matriz, pelos fibroblastos e miofibroblastos ativados por citocinas e fatores de crescimento.⁷¹⁻⁷⁴

Os componentes da matriz extracelular (MEC) fornecem suporte para as células e também regulam a comunicação intercelular. Eles são constituídos tanto por fibroblastos residentes como por células recrutadas e compreendem proteínas estruturais, tais como colágeno, proteoglicanos, fibronectina, fibras elásticas e moléculas de adesão, que sequestram e regulam citocinas e fatores de crescimento, como o TGF- β .⁶⁶ Em condições normais, os fibroblastos produzem pouca MEC.^{67,75} Por outro lado, na lesão tecidual, existe um aumento de citocinas e fatores de crescimento a partir de células inflamatórias, endoteliais, epiteliais e plaquetas. Esse processo resulta na ativação e na diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos contráteis e secretores, os quais produzem colágenos e outras proteínas da MEC, ativando fatores de crescimento e citocinas que, por sua vez, desencadeiam um aumento da fibrogênese, incluindo grandes quantidades de TGF- β .^{40,50,69, 70,75}

Biópsias de pele de pacientes com ES, quando comparadas com as de indivíduos saudáveis, mostram aumento significativo nos miofibroblastos, especialmente na camada mais profunda da derme, sendo observada uma forte correlação entre o número de miofibroblastos na pele e a pontuação de Rodnan, medida clínica que reflete a atividade da doença. Regiões com forte potencial para exacerbação de miofibroblastos incluem: (a) fibroblastos locais, (b) transdiferenciação de células epiteliais e endoteliais para mesenquimais ou ainda diferenciação em miofibroblastos, e (c) circulação de fibroblastos semelhantes a fibrócitos, que são derivados da medula óssea. Todo esse processo, por sua vez, é ativado por citocinas e fatores de crescimento, como o TGF- β .

^{72,74-77} Esse induz à formação de tecido fibrótico por meio da síntese de colágeno, estimulando fibroblastos e miofibroblastos e suprimindo, assim, a produção de metaloproteinases, as quais degradam a matriz pela indução de inibidores teciduais das metaloproteinases. ^{72,74-77}

Muitos autores identificaram anormalidades na via de sinalização de TGF- β na ES. Esse fator é secretado por várias células, incluindo fibroblastos, miofibroblastos, células T, monócitos, macrófagos e plaquetas, sendo sintetizado como um precursor latente que pode ser ativado por proteases (metaloproteinases 2 e 9), trombospondina 1 ou integrinas. ^{74,78-80}

Embora muitos tipos de células expressem receptores de TGF- β na ES, esses são produzidos e regulados pelos fibroblastos. Sua transdução de sinal é complexa e envolve múltiplos receptores primários e acessórios, vários receptores intermediários de sinalização, fatores de transcrição, coativadores, repressores e de proteólise. ^{78,81} A sinalização do TGF- β leva à fosforilação da família de proteínas SMAD. Essas moléculas são ativadas por TGF- β e abrangem várias proteínas quinases e sua desregulação pode contribuir para a resposta fibrogênica anormal. Embora o TGF- β seja considerado um regulador mestre de muitas doenças fibróticas, incluindo a ES, levando a uma variedade de efeitos indesejáveis, tendo em conta os seus diversos papéis na regulação de fibrose, algumas de suas ações fibróticas são perpetuadas e desencadeadas pelos CTGF e ET-1. ^{79,82,83}

Ambos, CTGF e ET-1, interagem com o TGF- β , confirmando a presença de ligações autócrinas que envolvem TGF- β , CTGF e ET-1 como fatores de ativação persistente de fibroblastos na ES ⁵². A ET-1 é normalmente produzida por células endoteliais, mas é altamente expressa pelos fibroblastos. ^{82,76,79,83}

Os níveis séricos de CTGF são elevados em pacientes com ES, assim como sua expressão pelos fibroblastos. A proteína recombinante CTGF estimula a produção de colágeno, fibronectina e a expressão da integrina em fibroblastos, podendo coordenar as ações do TGF- β na proliferação de fibroblastos e produção de MEC, conduzindo à fibrose tecidual (**Figura 4**). ^{66,82}

Figura 4. Proposta dos mecanismos patogênicos envolvidos na ES. 1) Possivelmente, a doença inicia-se com um evento estimulante no nível da vasculatura, provavelmente no endotélio. O estímulo pode ser uma infecção viral, um ataque sobre o endotélio por autoanticorpos, uma toxina ou estresse oxidativo. Como decorrência do dano endotelial e apoptótico, há um aumento na permeabilidade vascular que se manifesta nos primeiros estágios clínicos como edema tecidual. 2) O compartimento vascular é ainda comprometido devido à diminuição e alteração na angiogênese e vasculogênese (menos células progenitoras endoteliais). A liberação de agentes vasoconstritores supera a liberação de vasodilatadores, levando à instabilidade vascular; o endotélio danificado serve como estímulo para a ativação plaquetária, conduzindo à formação de pequenos trombos que contribuem ainda mais para a isquemia-reperfusão, o que resulta em repetidas microlesões e geração de ROS. 3) O endotélio danificado com moléculas de aderência e quimiocinas atrai os leucócitos, permitindo o desenvolvimento tanto inato quanto adaptativo das respostas imunológicas, incluindo a perda da tolerância a diferentes antígenos oxidativos (exemplo: topoisomerase 1). As células B amadurecem e formam células plasmáticas secretoras de anticorpos, propagando a resposta autoimune, enquanto as células T diferenciam-se em vários subconjuntos, incluindo células de linhagem Th2, as quais podem desempenhar um papel importante na fibrose tecidual. Os anticorpos antitopoisomerase1 formam imunocomplexos mediados por receptores da via Fc (FcRs) e ativados por receptores endossomais (Toll-like - TLRs) nas células do sistema imunológico (dendríticas e plasmócitos), que leva à produção do fator de interferência tipo I (INF1). 4) Finalmente, os fibroblastos são recrutados e ativados por citocinas e múltiplos fatores de crescimento para a formação de miofibroblastos. A presença destes fatores de crescimento, como o TGF- β , estimula de maneira desregulada os miofibroblastos e os fibroblastos. Essa ativação leva à deposição excessiva de colágeno e outras proteínas da MEC, o que eventualmente ocasiona fibrose tecidual, observada na ES. Esse processo fibrótico parece ser resultado do depósito e formação exacerbados de colágeno, estabelecendo uma correlação positiva entre o aumento de fibras colágenas e a perpetuação

fibrosante no quadro patogênico da esclerodermia. **Fonte:** Adaptado de Katsumoto TR, *et al.* 2011.³¹

1.3. MECANISMO DE SINALIZAÇÃO DO FIBROBLASTO NA ES

A fibrose é o processo principal na ES, ela substitui gradualmente a fase inflamatória vascular e altera a arquitetura do tecido afetado. Esse processo se inicia na derme da camada subcutânea, ocasionando prejuízo da microvasculatura, diminuição dos anexos cutâneos, perda da estrutura reticular e cristas epiteliais.^{69,75}

A composição da matriz varia de acordo com o grau da doença, porém, na maioria dos casos, há o predomínio de diferentes tipos de colágenos, proteoglicanos e fibras elásticas. Os danos microvasculares, a presença de infiltrados de células mononucleares, assim como as lesões teciduais estão presentes em vários estágios da esclerodermia, no entanto, em estágios mais avançados, verifica-se a prevalência de fibras espessas de colágeno tipo I, produzidos principalmente por fibroblastos modificados.^{2,12,19,29}

Os fibroblastos, principal tipo celular do tecido conjuntivo propriamente dito, são as células mais comuns do tecido conjuntivo frouxo (ou areolar); elas apresentam formato fusiforme, ou estrelado, com longos prolongamentos citoplasmáticos afilados que se ramificam. Os fibroblastos atuam na síntese e secreção dos componentes da matriz extracelular, incluindo a substância fundamental e as fibras do tecido conjuntivo, formadas por colágeno (fibras colágenas e reticulares) e elastina (fibras do sistema elástico). Após uma injúria tecidual e durante o reparo das feridas, eles proliferam rapidamente e tornam-se fibroblastos ativos, para sintetizar novos componentes da MEC.⁷⁵

Na pele e no pulmão, existem subpopulações de fibroblastos que podem definir regiões em um mesmo órgão, dependendo do fenótipo dos fibroblastos, pois estas células apresentam uma memória posicional com perfis de expressão de genes distintos. Além disso, os fibroblastos são quimiotáticos, podem migrar e se depositar em novas áreas em resposta a citocinas secretadas. Outro fato curioso é que essas células têm a capacidade de se diferenciar em subgrupos semelhantes, como, por exemplo, em miofibroblastos.^{75,84}

Os miofibroblastos são raramente encontrados na fisiologia humana saudável, no entanto, são evidenciados na resposta à cicatrização de feridas. Eles se originam de uma variedade de células precursoras, além dos fibroblastos (células epiteliais, endoteliais, pericitos, monócitos, multipotentes e fibrócitos), como demonstrado na **Figura 5**.

Figura 5. Células precursoras de miofibroblastos. **Fonte:** Adaptado de Kendall RT, Feghali-Bostwick CA, 2014.⁷⁵

A ativação dos fibroblastos ocorre por meio de duas vias de sinalização: autócrina e parácrina. Os fatores parácrinos podem atuar como pró-fibróticos ou ser antagonistas a esse processo. Podem atuar como fatores parácrinos pró-fibróticos o PDGF, as interleucinas 6 e 13 (IL-6 e IL-13) e os leucotrienos eicosanoides, que são moléculas provindas do processo inflamatório ou de uma resposta fibrótica.^{75,82,85}

Por outro lado, o PDGF é produzido por uma variedade de células musculares lisas e macrófagos. Atua no mesênquima e fibroblastos, induzindo processos de proliferação, diferenciação e produção de MEC e apresentando um importante papel na cicatrização, inflamação, angiogênese e fibrose. Já a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que atua sobre diferentes tipos celulares, produzida por células T, macrófagos, células do músculo esquelético e fibroblastos. Essa citocina apresenta funções bem conhecidas na inflamação, diferenciação celular e fibrose.⁸² Em pacientes

com ES, a IL-6 é produzida em excesso pelos fibroblastos, sendo também encontrada em altos níveis no sangue periférico.^{75,82,85}

Outra citocina importante nesse mecanismo é a IL-13, produzida principalmente por mastócitos e linfócitos. Ela atua nos fibroblastos e processos de inflamação e fibrose, podendo estimular a produção de TGF- β , colágeno, expressão de metaloproteinases (MMPs), proliferação de fibroblastos e diferenciação em miofibroblastos.^{86,87} Os leucotrienos são sinais adicionais eicosanoides que induzem à proliferação de fibroblastos e produção de matriz para a fibrose.⁸⁸

No que se refere aos fatores parácrinos atuantes em fibroblastos, temos a prostaglandina eicosanoides E2 (PGE2) e a prostaciclina 2 (PGI2), dois exemplos de sinais parácrinos inibidores da resposta fibrótica. A PGE2 inibe a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno, atua sobre as células-alvo, ativando os receptores G acoplados à proteína do PE, tem a capacidade de inibir a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e sobre o TGF- β , da mesma forma que estimula a expressão de α -actina do músculo liso (α SMA) em fibroblastos de pulmão por meio dos receptores do subtipo EP2. Já a PGI2 está presente nos medicamentos para o tratamento de ES por dilatar os leitos vasculares e as artérias de maneira sistêmica.⁸⁹

Adicionalmente, temos as ações autócrinas entre os fibroblastos, sendo o TGF- β e as citocinas IL-1 β e IL-6 exemplos de substâncias produzidas pelos fibroblastos e que atuam sobre ele mesmo, promovendo respostas inflamatórias e fibróticas (**Figura 6**).

75,82

Figura 6. Visão geral dos fatores envolvidos na programação pró-fibrótica de miofibroblastos e fibroblastos. **Fonte:** Adaptado de Kendall RT, Feghali-Bostwick CA, 2014.⁷⁵

Os TGFs- β podem agir sobre os fibroblastos e miofibroblastos, induzindo à transformação oncogênica e ainda podendo desencadear proliferação, migração, produção de MEC e sinais quimiotáticos, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para o local da lesão, fibrose e diferenciação de miofibroblastos.^{51,75}

Outro mecanismo autócrino importante está na expressão e liberação de citocinas, como a IL-1 β , que em resposta à inflamação, estimula a produção de outras citocinas pró-fibróticas, como o PDGF e o TGF- β , os quais retroalimentam a perpetuação do estímulo fibrótico, resultando no aumento da produção de fibras de colágeno no tecido afetado (**Figura 7**).^{75,82,85}

Figura 7. Ativação do fibroblasto na Escleroderma. Fatores externos, tais como as interleucinas, quimiocinas, trombina, endotelina-1, fatores de crescimento, ROS e anticorpos ativados desencadeiam uma cascata de sinalização em fibroblastos. A fosforilação de Smad2 desencadeia uma cascata de sinalização do Smad3 para o Smad1, que interage com o Smad4 e regula a transcrição de genes no núcleo. A ativação do TGF- β e seu receptor (TGF- β R) também

resultam na ativação de vias não envolvendo proteínas Smad, modulando assim fatores de transcrição. Essas vias se cruzam, induzidas por ativação de receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), levando a uma complexa rede de sinalização intracelular. Proteínas da matriz extracelular, citoesqueleto, citocinas, receptores de citocinas, CTGF, quinases 1 e 2 (ERK1/2), actina de músculo liso (α -SMA) e elemento de resposta a soro (SRE) são estimulados e participam de uma vasta sinalização ativada e sustentada pelo fibroblasto. **Fonte:** Adaptado de Gabrielli *et al*, 2009.⁵¹

Além dos mecanismos de sinalização e ativação acima citados, existem grupos de proteínas que são de grande importância na transdução de sinais entre a MEC e a membrana celular. Entre esses grupos estão as glicoproteínas adesivas e as integrinas, que são estruturalmente diversas, mas apresentam uma propriedade em comum: ligar-se, por um lado, aos componentes da MEC e, por outro, às proteínas específicas integrantes da membrana celular, ligando, portanto, os componentes da MEC uns aos outros e às células.

As integrinas constituem a principal família de receptores de superfície celular que medeiam a fixação da célula à MEC. Até o momento, pelo menos 18 e 8 subunidades têm sido descritas formando heterodímeros com 24 receptores diferentes de integrina, responsáveis pelas interações célula-célula e célula-matriz. Essas proteínas desempenham importantes funções biológicas e são peças-chave no extravasamento de leucócitos, participando da agregação plaquetária, processos de desenvolvimento e cicatrização das feridas.^{28,90} Ainda, alguns tipos celulares exigem adesão a proteínas da MEC para que possam proliferar e se fixar; a ausência dessa adesão resultaria em morte celular programada e/ou apoptose. Os domínios extracelulares das integrinas ligam-se a muitos componentes na MEC, como a fibronectina, a laminina e alguns tipos de colágeno, por meio da sequência RGD (Arginina-Glycina-Aspartato) e seus ligantes, que estão presentes nas cadeias α do colágeno em proporções diferentes, de acordo com seus tipos. Existe ainda um grupo de integrinas que não reconhece as sequências de aminoácidos lineares, mas reconhece sítios específicos dentro da molécula de colágeno e laminina.^{28,90}

Na literatura médica, é consenso a participação de diferentes subunidades de integrinas na patogênese da ES. Alguns autores sugerem que o aumento da subunidade α V β 3 pode diminuir a atividade do gene promotor para a cadeia α 2(I) em fibroblastos de pele de pacientes com ES.⁹¹

1.4. COLÁGENO

O colágeno é uma glicoproteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular. Ele está presente em quase todos os tecidos, assim como na pele, sendo responsável por grande parte das propriedades físicas teciduais. As características biomecânicas dos tecidos resultam da organização dos colágenos em macromoléculas que fornecem não apenas suporte, mas apresentam importante papel funcional, determinado pelos domínios proteicos adicionais colagenosos. Sabe-se que além de atuar como suporte, o colágeno também participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular. Além das funções citadas, essa proteína pode exercer atividade antigênica, variando de acordo com o tipo de colágeno e órgão envolvido.⁹²⁻⁹⁴

Até o momento, são descritos 28 tipos de colágeno em vertebrados, numerados com algarismos romanos (I-XXVIII).⁹⁵ As moléculas de colágeno são formadas pelo entrelaçamento de três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , arranjadas numa conformação de tripla hélice, que se estabiliza por pontes de hidrogênio intercadeia, conferindo à molécula alta estabilidade, rigidez e forma de bastão.⁹² Essas cadeias podem ser idênticas (homotriméricas) ou distintas (heterotriméricas), sendo essas últimas mais frequentes.

As cadeias α do colágeno podem variar em tamanho, desde 662 até 3152 aminoácidos, e cada uma delas possui uma sequência de aminoácidos característica^{96,97}, além de uma série de repetições da sequência de aminoácidos Glicina-X-Y, na qual X é frequentemente prolina e Y, hidroxiprolina⁹⁴ (**Figura 8**). Além disso, essas cadeias possuem sequências adicionais de 15 a 20 aminoácidos que não fazem parte da tríplice hélice e são denominadas de telopeptídeos, também conhecidos como extensão não colagenosa (NC) da molécula. Existem duas extensões, a NH₂ (aminoterminal) e COOH (carboxiterminal). Há evidências de que o domínio COOH contém informações essenciais para a formação da tríplice hélice, enquanto o NH₂-terminal apresenta dados importantes para a regulação final do diâmetro das fibrilas.^{94,98}

Figura 8. Esquema ilustrativo da hélice tripla do colágeno. Em (a) mostra a primeira estrutura cristalina de alta resolução de uma tripla hélice do colágeno formado a partir de (ProHypGly)₄ - (ProHypAla) - (ProHypGly)₅. Em (b) observa-se o eixo de uma tripla hélice (ProProGly)₁₀ com três linhas preenchidas demonstradas como uma fita. Em (c) nota-se a tripla hélice destacando-se pela ligação com hidrogênio. Observam-se em (d) os três tipos de ligação para esse papel. **Fonte:** Adaptado de Shoulders MD e Raines RT, 2009.⁹⁹

Os colágenos podem ser divididos em subfamílias, com base na sua estrutura supramolecular: colágenos fibrilares que possuem a tripla hélice ininterrupta (colágeno tipo I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII); formadores de rede (colágeno tipo IV, VI, VIII, X); associados a fibrilas com tripla hélice interrompida (FACITs; IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII); associados a membrana com tripla hélice interrompida (XIII, XVII, XXIII, XXV); MULTIPLEXINs (XV, XVIII) e de ancoragem (VII) (**Figura 9**).
92,95

Figura 9. Estruturas supramoleculares formadas por colágenos. **Fonte:** Adaptado de Ricard-Blum, 2011.⁹⁵

A biossíntese do colágeno é extensivamente estudada em colágenos que formam fibrilas, que são sintetizados como moléculas de pró-colágeno, formadas por um propeptídeo amino-terminal (NH₂), seguido por um curto N-telopectídeo não helicoidal, uma tripla hélice central, um C-telopectídeo e um propeptídeo carboxi-terminal (COOH).⁹⁵ No processo de biossíntese, há diversas etapas bioquímicas que se iniciam no núcleo com a transcrição gênica, estimulada por fatores de crescimento, incluindo o TGF- β .⁹³ Após a tradução, as cadeias pró-alfa sofrem várias modificações pós-translacionais no retículo endoplasmático rugoso, tais como hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina e posterior glicosilação dos resíduos de lisina e hidroxilisina,

sendo essa última fundamental para a formação das pontes cruzadas intramoleculares de hidrogênio.^{92,94,95,99}

No retículo endoplasmático rugoso, após solvatação dos resíduos de tirosina, as três cadeias alfas entrelaçam-se formando as moléculas em forma de tripla hélice, estabilizadas por pontes de hidrogênio. Essas moléculas de pró-colágeno são empacotadas no complexo de Golgi e secretadas na matriz extracelular em forma de pró-colágeno (**Figura 10**).¹⁰⁰⁻¹⁰²

Figura 10. Diagrama esquemático da biossíntese dos colágenos fibrilares. **1)** As cadeias pró-alfa são sintetizadas no lúmen do retículo endoplasmático. **2)** Posteriormente, essas cadeias sofrem hidroxilação de alguns resíduos de prolina e lisina. Em seguida, as hidroxilisinas sofrem glicosilação ou glicosilação e as três cadeias pró-alfa entrelaçam-se formando a tripla hélice de pró-colágeno, que é empacotado no complexo de Golgi e secretado. **3)** Já no espaço extracelular, os pró-peptídeos amino e carboxi-terminal são clivados e as moléculas recém-formadas de colágeno agregam-se, **4)** originando as fibrilas que, por sua vez, unem-se, formando as fibras de colágeno.¹⁰¹

Em geral, após secreção na matriz extracelular, os pró-peptídeos amino e carboxi-terminais são removidos das cadeias alfa pelas NH₂ e COOH-proteinase. Esse processo resulta em uma molécula nativa de tripla hélice, com dimensões aproximadas de 300nm de comprimento e 1.5nm de diâmetro, a qual retém os telopeptídeos curtos, com poucos aminoácidos. No processo de fibrilogênese, as moléculas de colágeno agregam-se segundo uma orientação cabeça-cauda, formando as fibrilas de colágeno.^{92-94,100-102} Essas apresentam um padrão de bandeamento com uma periodicidade (D) que varia de 64nm a 67nm e, quando analisadas por microscopia eletrônica, revelam a presença característica de bandas claras e escuras.¹⁰³

1.4.1. Colágeno na Pele

A pele humana consiste em duas camadas morfologicamente diferentes: uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. A epiderme funciona como uma barreira protetora, composta principalmente pelos queratinócitos. A derme é uma camada mais profunda, composta essencialmente por colágeno, além de fibras elásticas, elastina, glicosaminoglicanos, íons e água. Ela apresenta duas subcamadas: a derme papilar, que fica em contato com a epiderme e é formada por tecido conjuntivo frouxo, e a derme reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras de colágeno, as quais concedem força e elasticidade à pele. Na derme, também se localizam os vasos sanguíneos que nutrem a epiderme, vasos linfáticos, nervos, estruturas anexas, tais como pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas. Em continuidade com a derme, encontra-se a hipoderme, que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas serve de suporte para os órgãos subjacentes, ajudando a uni-los. (**Figura 11**).^{104,105}

Entre a epiderme e a derme, encontra-se a membrana basal, uma camada fina, com cerca de 40nm a 120nm de espessura, flexível e constituída por proteínas da matriz extracelular. Essas proteínas atuam como suporte de todas as células do tecido, além de funcionarem como proteínas de ligação, como é o caso da caderina, que tem a função de ligar célula-célula, e das integrinas, que medeiam as ligações célula-membrana. Na

maioria das vezes, a membrana basal é disposta sob o formato de lâmina, sendo constituída por colágeno IV, nidogênio e proteoglicano perlecan.^{104,105}

Figura 11. Ilustração da pele humana normal. O epitélio age como uma barreira, protegendo o tecido externo. A derme papilar possui uma rede fina de fibras elásticas e de colágeno; sua principal função é fixar a membrana basal. A derme reticular, por sua vez, garante força e estabilidade à pele, sendo composta por anexos (glândulas sudoríparas, folículos pilosos), grande quantidade de colágenos e fibroblasto.^{104,105}

A pele normal é constituída por diferentes tipos de colágeno, sendo os tipos I e III os mais abundantes. O colágeno tipo I encontra-se em todas as camadas desse órgão, já o tipo III está presente principalmente na adventícia da pele.^{92,97,101,102}

O colágeno do tipo I, pertencente ao grupo dos colágenos fibrilares, é mais espesso que os demais e é heterotrimérico. É formado por duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ [$\alpha 1(I)$]₂, $\alpha 2(I)$, a partir dos genes COL1A1 e COL1A2.^{92,97} Estima-se que mais de 90% de todas as moléculas de colágeno no corpo são do tipo I. Estudos recentes sugerem que o diâmetro das fibrilas é inversamente proporcional à flexibilidade molecular do colágeno,¹⁰ o qual exerce um importante papel como substrato adesivo para muitas células, além de participar do desenvolvimento de órgãos e tecidos por meio dos processos de migração, proliferação e diferenciação celular e na cicatrização e remodelamento tecidual. As células reconhecem o colágeno tipo I nativo através das

integrinas, do meio extracelular para o intracelular e ativam a secreção de algumas proteínas específicas, assim como as do citoesqueleto de actina.¹²

Outro importante colágeno fibrilar presente na pele é o tipo III. Esse é homotrimérico, formado por 3 cadeias $\alpha 1$ idênticas $[\alpha 1(\text{III})]_3$, ligadas por pontes de sulfeto. Está presente na derme, formando fibras reticulares finas, com cerca de 20nm de diâmetro. Apesar disso, ele também contribui para a sustentação da pele e estima-se que represente cerca de 15% do total de colágeno nesse tecido. Ainda, esse tipo de colágeno possui alto teor de glicosilação e associa-se a glicoproteínas e proteoglicanos da matriz extracelular da pele.^{9,10}

Embora o colágeno tipo V também seja fibrilar, ele representa cerca de 2% a 5% do total de fibras de colágeno na pele, sendo considerado um dos menores colágenos fibrilares. Esse apresenta-se na pele de isoformas diferentes: uma homotrimérica, com três cadeias $\alpha 1$ idênticas $[\alpha 1(\text{V})]_3$, que atua como ponte molecular na estabilização da interface dermo-epidérmica; e outra heterotrimérica, com duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ $[\alpha 1(\text{V})]_2, \alpha 2(\text{V})$, a qual participa tanto na organização quanto na estabilidade da matriz extracelular.^{9,10,27} Durante a sua síntese, diferentemente dos outros colágenos fibrilares, a cadeia $\alpha 1$ do colágeno tipo V retém o domínio globular pró-peptídeo amino (NH_2)-terminal.¹⁰⁶

Tanto na pele como em outros tecidos, os colágenos tipos I, III e V copolimerizam-se para formar fibrilas heterotípicas, ou seja, constituídas por colágenos diferentes. O colágeno tipo V localiza-se no interior das fibrilas heterotípicas e é considerado o nucleador dessas fibrilas.¹⁰⁷ A principal função dele é regular o diâmetro das fibrilas heterotípicas, devido ao domínio globular amino-terminal da cadeia $\alpha 1$, que se projeta para fora das fibrilas heterotípicas, dificultando fisicamente a agregação de fibrilas de colágenos tipos I e III.^{92,97,107,108} Assim, quando o colágeno tipo V encontra-se em maior proporção, as fibras heterotípicas são mais finas; apresentando menor proporção, elas são mais grossas, como ilustrado na **Figura 12**.

Figura 12. Desenho esquemático da interação dos colágenos I, III e V na formação da fibra heterotípica. **A)** Visão transversal mostrando fibrilas heterotípicas. O colágeno V desempenha função na regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas; a região amino terminal projeta-se para a superfície externa da fibrila, que bloqueia a agregação de moléculas de colágenos I e III. **B)** Quando o colágeno V encontra-se em maior proporção, as fibras heterotrímeras são mais finas e, em menor proporção, elas são mais grossas. **Fonte:** Adaptado de Birk 1990¹⁰⁷.

Outro colágeno presente na pele é o tipo IV, pertencente à família dos colágenos formadores de rede e associado aos colágenos fibrilares. É o principal constituinte da membrana basal, juntamente com outros constituintes da matriz, como laminina, proteoglicanos e heparan sulfato, responsáveis pela força e elasticidade, adesão celular e controle da passagem de substâncias por meio da membrana basal.^{92,95}

Outros tipos de colágeno também estão presentes na pele, porém em menor quantidade, como é o caso do colágeno VI, que exerce um papel importante na integridade do tecido. Ele faz parte dos colágenos formadores de redes e suas cadeias $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ formam a tripla hélice por pontes de sulfeto.^{92,95}

O colágeno do tipo VII é pouco expresso na pele, representa apenas 0,001% do total de colágeno nesse tecido. Suas três cadeias $\alpha 1$ formam uma tripla hélice através de pontes de sulfeto. Esse tipo possui um papel importante nas fibrilas de ancoragem e participa na junção e aderência dermo-epidérmica.⁹⁵ Na literatura, também estão descritos os tipos XIV, XVI e XVII, os quais são muito pouco expressos; no entanto, o XVII é um dos principais componentes estruturais do hemidesmossoma e participa da junção dermo-epidérmica.^{92,95,109}

1.4.2 Colágeno tipo V

O colágeno tipo V é ubiquamente distribuído, sendo encontrado na maioria dos tecidos. Esse tipo de colágeno caracteriza-se por compor diferentes isoformas, das quais a mais frequente é a heterotrimérica [a1(V)]2, a2(V), que está presente no interstício de órgãos, como pele,¹¹⁰ pulmão,¹¹⁰ esôfago, rins, estroma da córnea^{110,111} e outros.^{4,29,31,32} Além dessa, diferentes isoformas também são encontradas: heterotrimérica, com três cadeias distintas a1(XI)a1(V)a3(XI), presente em placenta humana e bovina; homotrimérica [a1(V)]3, vista no endométrio de camundongos e região da interface dermo-epidérmica.^{112,113}

Como citado anteriormente, o colágeno tipo V é quantitativamente o menor componente de tecidos que contém fibrilas heterotípicas, variando de 2% a 5% do total de fibras.

As informações para a síntese de colágeno tipo V vêm de genes diferentes. O *COL5A1* contém informações transcricionais para a formação da cadeia pró- $\alpha 1(V)$.^{92,101} Esse gene está localizado no (q) do braço longo do cromossomo 9, entre as posições de 34,2 e 34,3, mais precisamente a partir do par de bases 134.641.804 e 134.844.842. O gene *COL5A2* está localizado no (q) do braço longo do cromossomo 2, entre as posições 14 e 32, a partir do par de bases 189.031.914 e 189,179,878 (**Figura 13**). O gene do *COL5A3* está localizado no braço (p) no cromossomo 19 (19p13.2) do exon 67 e pouco se sabe sobre ele.^{114,115}

Figura 13. Representação da localização dos genes COL5A1 e COL5A2. Em **A)** observa-se a localização no cromossomo do gene COL5A1 em 9q34.2-q34.3 no exon 67, já em **B)** pode-se observar a localização do gene COL5A2 em 2q14-q32 no exon 54.

Esses genes codificam cadeias de polipeptídeos com vários domínios e características comuns a todos os colágenos fibrilares: um peptídeo sinal; uma região não colagenosa N-terminal (NC3); um domínio N-terminal curto com repetições Gli-X-Y de tripla hélice interrompida (COL2); um domínio não colagenoso curto (NC2 ou “dobradiça”); um domínio principal tripla hélice helicoidal de contínuas repetições (Gli-X-Y) (COL1) e um domínio C-pró-peptídeo não colagenoso.¹¹⁶

O colágeno tipo V é sintetizado na forma de pró-colágeno com os N- e C-pró-peptídeos terminais, os quais no ambiente extracelular são clivados por enzimas específicas para a produção da molécula de colágeno. Os N- e C-pró-peptídeos do colágeno tipo V diferem dos outros colágenos fibrilares, por isso é que atualmente esse colágeno é considerado pertencente à subclasse de colágenos fibrilares reguladores, caracterizados por transformação incompleta do N-propeptídeo (**Figura 14**).^{92, 101, 116}

Figura 14. Estrutura do Colágeno tipo V. **A)** Colágeno V formado por três cadeias α . A estrutura dos domínios das cadeias α juntamente com o número de aminoácidos (aa) para a cadeia $\alpha 1$. Todas as cadeias contêm o pró-peptídeo C-terminal (NC1). Uma pequena porção da sequência não colagenosa (C-telopeptídeo) permanece na extremidade C-terminal. O domínio colagenoso (COL1) é composto por uma sequência de Gly-X-Y. O (COL2) é o domínio N-terminal que está separado do domínio COL1 por um domínio não colágeno (NC2). Nas cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 3$ o domínio N-terminal (NC3) é composto por um domínio PARP (prolina e arginina) e um domínio variável VAR. Os locais de clivagem das N- e C-proteinase estão indicadas ($\downarrow$). **B)** A estrutura da isoforma mais comumente encontrada do colágeno V [$\alpha 1(V)$] $2\alpha 2(V)$ é apresentada. **C)** Formação das fibrilas heterotípicas de colágenos I e V. O colágeno tipo I forma um arcabouço da fibrila e o colágeno tipo V, que retém um domínio globular N-terminal, localiza-se no interior da fibrila. Esse domínio globular, voltado para o exterior da fibrila, impede a agregação de mais moléculas de colágeno e, desse modo, regula o diâmetro das fibrilas heterotípicas. **Fonte:** Adaptado de Smith SM, Birk DE, 2012. ¹¹⁶

Os C-pró-peptídeos são removidos por clivagem do domínio NC1. O N-pró-peptídeos é composto pelos domínios NC3, COL2 e NC2. O domínio de NC3 das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 3$ do colágeno tipo V tem um domínio proteico, rico em prolina e arginina (PARP), e uma variável (VAR). O processamento do N-pró-peptídeo das cadeias do tipo V envolve a clivagem por N-proteinases, no domínio NC2 na cadeia $\alpha 2$ (V), e clivagem entre PARP e domínios variáveis das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 3(V)$. Isso resulta na retenção de um domínio não colagenoso N-terminal, um domínio COL2 e uma região de dobradiça (NC2). Como consequência desse processamento diferencial, o tipo V forma fibrilas heterotípicas com os colágenos I e III, de modo que o grande domínio COL1 participa na formação de uma matriz alternada dentro da fibrila heterotípica. No entanto, a região do domínio globular NC3 não clivada é incompatível com a organização escalonada dos domínios COL1, e a dobradiça e os domínios COL2 e NC3 são projetados para o exterior sobre a superfície das fibrilas.¹¹⁶

O colágeno tipo V regula a fibrilogênese por nucleação de fibrilas de colágeno em formação (**Figura 15**).^{101, 102, 107,117}

Quantidades variáveis de colágeno tipo V interferem no diâmetro das fibrilas heterotípicas. Assim, tecidos com menos colágeno tipo V têm fibrilas com diâmetro maior e tecidos com mais colágeno tipo V, como a córnea ou vítreo, têm fibrilas finas.^{106,110,111} Estudos demonstram que o diâmetro das fibrilas parece ser inversamente proporcional à flexibilidade molecular do colágeno.^{107, 117}

Enquanto a cadeia $\alpha 1(V)$ está relacionada com a regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas, a $\alpha 2(V)$ é importante na regulação da fibrilogênese.^{106, 117, 118, 134} Já a função e a expressão da cadeia alfa 3 do colágeno V é desconhecida.

O colágeno tipo V possui uma série de características peculiares. Dessa forma, devido à retenção do N-pró-peptídeo terminal, região reconhecida como possuindo alta imunogenicidade, esse colágeno é mais imunogênico que outros fibrilares.^{101,115,117} Além disso, as propriedades do colágeno V de adesão, migração e proliferação celular estão em grande parte relacionadas às sequências RGD (arginina, glicina e ácido aspártico), presentes em maior quantidade na cadeia $\alpha 2$ que na $\alpha 1$.¹¹⁹ A adesão do colágeno V às células é mediada principalmente pelas integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$, que são receptores presentes nas membranas das células e dependem da conformação em tripla hélice do colágeno.^{119,120}

Figura 15. Desenho esquemático da interação dos colágenos I e V nas fibrilas heterotípicas.
Fonte: Adaptado de Adler's Physiology of the Eye 2011.¹²¹

A adesão do COLV às células pode também ocorrer independentemente das sequências RGD. Nesse aspecto, foi demonstrado que a porção tripla hélice da cadeia $\alpha 1$ do COLV possui um fragmento de 30 Kd, o qual contém um agrupamento de resíduos de aminoácidos básicos, com grande afinidade em relação à heparina e ao sulfato de heparina.^{122,123}

Ainda, foi demonstrado que o COLV possui um anel altamente carregado positivamente em torno da molécula, particularmente evidente para a cadeia $\alpha 1(V)$, que poderia reforçar a sua interação com as moléculas de heparina aniônica. Desse modo, o sítio do COLV ligante da heparina interage com os PG de sulfato de heparan na superfície das

células, desencadeando sinais de estimulação celular; e, ainda, interage com o PG de sulfato de heparan na MEC dos tecidos. Para que essa ligação se complete o COLV deve apresentar-se sob a forma de tripla hélice. Além disso, o COLV, em pH e força iônica fisiológicos, possui maior afinidade com a heparina e o heparan sulfato que outros tipos de colágeno.^{122,124}

Além das funções clássicas atribuídas ao colágeno tipo V, esta proteína está relacionada à indução de apoptose, regulando a expressão desses genes e da resposta ao “estresse” em linhagem de células neoplásicas no câncer de mama.^{125,126} Mutações nos genes do colágeno do tipo V, COL5A1 e COL5A2, podem gerar anormalidades estruturais na córnea, tornando-as mais finas e frágeis.^{125, 127}

Mais de 50% dos casos da síndrome de Ehlers-Danlos clássica são causados por mutações no gene COL5A1 e COL5A2. Muitas dessas mutações levam a uma formação errônea, do pró-alfa 1 e pró-alfa 2 (V), resultando na não formação das fibrilas de colágeno V na pele e em outros tecidos;^{128,129} porém, o mesmo não acontece com o gene do COL5A3, que permanece ausente nestes pacientes.¹³⁰

Uma doença facilmente confundida com a ES é a síndrome da pele endurecida. Os pacientes portadores dessa patologia têm mutações missense heterozigotos no domínio do TGF- β e fibronectina, no entanto nada foi encontrado a respeito das cadeias do colágeno V.^{131,132}

Estudos recentes em tecido pulmonar de pacientes com ES demonstram que o RNAm da cadeia $\alpha_2(V)$ está mais expresso, quando comparado com o interstício normal, sugerindo uma relação entre a alteração das isoformas moleculares e as alterações na função do tecido pulmonar nessa enfermidade.¹³³ Esse mesmo padrão de alteração também foi encontrado em estudos realizados em pele de pacientes com ES.¹³⁴

Observou-se também, em modelo experimental de ES induzida em coelhos saudáveis, que após inoculação de colágeno V, esses animais desenvolveram fibrose progressiva, vasculopatia na pele e órgãos internos, como pulmão, esôfago, coração, rins e sinóvia, além de auto-anticorpos, como FAN, antitopoisomerase-I e anticolágenos I, III, IV, bem como imunocomplexos.¹³⁵ Dessa maneira, o remodelamento encontrado na pele desses animais é constituído de uma grande quantidade de colágeno V de fibras grossas e bastante expressas, contrastando com o perfil fibrilar dos coelhos não imunizados, os quais exibem fibras finas, típicas de uma pele normal. Ressalta-se assim a importância

do COLV nessa patogenia, bem como o agravamento do processo fibrótico tão característico em pacientes com esclerodermia.^{135, 136}

Mutações no gene COL5A2 em humano, que codifica a cadeia $\alpha 2(V)$, não foram relatadas anteriormente. No entanto, Andrikopoulos e colaboradores 1995, suprimiram o exon 6 do gene COL5A2 e observaram, em camundongos, uma anormalidade conformacional de aminopropeptídeo da cadeia $\alpha 2(V)$. Nos animais homozigóticos, essas alterações assemelharam-se a Ehlers-Danlos I, desencadeadora de deformidades graves na pele e olhos, causadas pela desorganização e pelo alargamento de fibrilas contendo colágenos tipos I, III e V. Já nas formas heterozigóticas, esses animais não apresentavam uma alteração fenotípica aparente, entretanto, em análise histológica foram observadas anormalidades nas fibras de colágeno na córnea.¹³⁷ Animais obtidos pelo cruzamento de camundongos com defeito no gene COL5A2 exibiram fragilidade na pele, além de alterações na organização das fibras de colágeno e alterações esqueléticas.¹³⁸

Em 2007, pesquisadores examinaram a utilidade do RNA de interferência (RNAi) na regulação da expressão do COL1A1 e do COL3A1 em fibroblasto de pele humana e verificaram que, quando silenciada uma cadeia específica de colágeno, não há variação na expressão das outras cadeias. Esses resultados indicam que o RNAi pode inibir especificamente a expressão dos genes alvos.¹³⁹ Outros autores, no ano anterior, também demonstraram que o silenciamento gênico pode anular os genes receptores de colágeno, resultando na diminuição da expressão gênica em pacientes com ES.¹⁴⁰ Muitas são as tentativas de conter o acometimento da pele desses pacientes e, conseqüentemente, a evolução da doença para os órgãos internos.¹⁴⁰ Entre elas está o RNAi, utilizado para várias proteínas envolvidas na patogênese das doenças.^{139, 140}

Visto que o gene COL5A2 apresenta-se mais expresso na pele e pulmão de pacientes com ES^{133,134} e que a forma heterotrimérica do colágeno tipo V pode desencadear ES em coelhos sadios⁵⁶ e promover tolerância nasal em animais com ES,¹³⁵ torna-se de extrema importância verificar se a regulação da fibrila está comprometida e se a inibição temporária do gene COL5A2 pode interferir na fibrilogênese, possibilitando um entendimento quanto ao mecanismo fibrilar presente nessa doença.

2. OBJETIVO

Realizar análise morfológica e ultraestrutural das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, assim como avaliar a influência do gene COL5A2 na fibrilogênese do colágeno V na pele de pacientes com ES.

3. PACIENTES E MÉTODOS

O presente estudo é uma pesquisa experimental a partir de tecido cutâneo humano previamente coletado e fibroblastos, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 0331/10.

O tecido cutâneo e fibroblastos foram oriundas de um estudo prévio, também aprovado pelo CAPPesq, sob o número nº (0817/07) e, de acordo com a declaração de Helsinque, todos os participantes deram seu consentimento após informações detalhadas sobre o estudo e os potenciais riscos.

3.1. PACIENTES

Foram incluídos neste estudo 14 indivíduos, divididos em dois grupos: grupo de pacientes com ES (n=7), assim classificados segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e da Liga Europeia de Combate ao Reumatismo (EULAR),¹⁴¹ e grupo controle, formado por indivíduos saudáveis (n=7).

Nos pacientes com ES, a biópsia das peles foi realizada na região acometida na superfície dorsal do antebraço. Esses indivíduos eram virgens de tratamento e foram diagnosticados há dois anos ou menos, considerando-se o surgimento do primeiro sintoma não Raynaud.¹⁴² A avaliação da extensão do espessamento da pele foi realizada por meio do escore de Rodnan modificado (MRSS)¹⁴³ e a atividade da doença foi calculada pelo índice de atividade de Valentini,^{144,145} que se refere à avaliação de 10 parâmetros, conforme a **Tabela 2**, sendo que a doença é considerada ativa quando a soma desses itens é superior a 3.¹⁴⁵

Tabela 2. Índice de atividade de Valentini ^{143,144}

Parâmetros	Escore
MRSS >14	1,0
Escleroderma	0,5
Piora da pele *	2,0
Necrose digital	0,5
Piora vascular *	0,5
Artrite	0,5
DLCO < 80% do previsto**	0,5
Piora da dispneia *	2,0
Velocidade de hemossedimentação >30 mm na primeira hora	1,5
Hipocomplementenemia	1,0
Índice máximo de atividade	10

* deteriorização em relação ao último mês, avaliada pelo paciente.

** Capacidade de Difusão do Dióxido de Carbono.

Dois patologistas, que desconheciam os achados clínicos, revisaram as biópsias de pele. O diagnóstico histológico de ES foi confirmado quando pelo menos um dos seguintes critérios foi observado em lâminas coradas por H&E: ¹⁴¹

1: aparência normal da matriz extracelular na derme, mas presença de edema perivascular (Ed) ou infiltrado inflamatório mononuclear (**Figura 16, Painel A** setas);

2: fibrose leve, caracterizada pela presença de colágeno nos anexos (setas) e/ou tecido adiposo subcutâneo, associada ou não à perda de definição entre a camada papilar e reticular e a atrofia da epiderme (**Figura 16, Painel B**);

3: fibrose densa e uniforme da derme com perda dos anexos, associada à atrofia de epiderme (**Figura 16, Painel C**).

As lâminas dos controles evidenciaram ausência de qualquer doença cutânea (**Figura 16, Painel D**).

Figura 16. Diagnóstico histológico da ES e pele controle. **A)** pele de paciente com ES com aparência normal da derme, apresentando edema perivascular (Ed), observado como uma região rosa-claro ao redor dos vasos e infiltrado perivascular mononuclear (seta). **B)** pele de paciente com fibrose leve, apresentando encarceramento dos anexos cutâneos (Anex) por fibras de colágeno (Col, setas). A epiderme estaria no campo superior. **C)** Pele de paciente com ES com fibrose densa, caracterizada por fibrose uniforme com perda dos anexos e atrofia da epiderme. **D)** aparência normal da pele controle. Epi: epiderme. Coloração em H&E. Aumento de 200X.

A biópsia das peles foi dividida em duas partes; a primeira foi fixada em solução de formol a 10%, embebida em parafina, e seções de 3 a 4 µm foram coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E) e montadas em lâminas com 3-aminopropiltriethoxi silane (Sigma Chemical, USA) para análises adicionais. A outra parte foi cortada em pequenos fragmentos para realização da cultura primária de fibroblastos.

3.2. Biópsia de Pele

Após a antissepsia rigorosa na superfície dorsal do antebraço distal e a anestesia local com lidocaína 1% sem vasoconstritor, as biópsias de pele dos pacientes foram realizadas por *punch* (3mm). De acordo com protocolo já estabelecido, o fragmento

coletado foi seccionado em três partes: o primeiro fragmento de biópsia de pele foi fixado em glutaraldeído 2% para obtenção de preparações para microscopia eletrônica; o segundo foi fixado em solução de formol a 10%, por 24 horas, e submetido aos procedimentos histológicos de rotina para imunofluorescência e histomorfometria; por último, o terceiro fragmento foi armazenado em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; GIBCO) para cultura de fibroblastos. Os fragmentos de biópsia dos controles foram submetidos aos mesmos procedimentos.

3.2. IMUNOFLUORESCÊNCIA

3.2.1. *Imunofluorescência das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V*

Para a imunomarcção das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V, os cortes de 4 μ m de espessura das biópsias de pele de pacientes e controles foram aderidos em lâminas, previamente tratadas com *3-aminopropiltriethoxy Silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A reação foi iniciada pela desparafinização dos cortes através da imersão das lâminas em xilol aquecido a 60°C, por 20 minutos, seguida de 2 banhos de 10 minutos em xilol, à temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos, um banho em água destilada e 15 minutos em tampão Fosfato de sódio (PBS). Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos, os cortes foram submetidos à digestão com pepsina de porco (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, 10000 UTI/ml) 2mg/ml diluída em ácido acético 0,5N, por 30 minutos, a 37°C. Ao término da incubação, os cortes foram submetidos a um ciclo de três lavagens com PBS, por 10 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos, os cortes foram incubados com BSA 5% diluído em PBS, durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas, por uma noite, a 4°C, com os anticorpos policlonais anticadeia $\alpha 1(V)$ de camundongo¹⁴⁷ e anticadeia $\alpha 2(V)$ de coelho (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), numa diluição de 1:300 e 1:80 em PBS, respectivamente. Após esse período, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS/Tween₂₀ 0,05%, por três vezes de 10 minutos, e incubados por 60 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (Alexa Fluor

488, Invitrogen, Life Technology) e anti-IgG de coelho (Alexa Fluor 488; Invitrogen, Life Technology), diluídos 1:200 em PBS com azul de Evans 0,006%. Posteriormente, os cortes foram submetidos a outro ciclo de lavagens, com PBS/Tween₂₀ 0,05%, e as lâminas montadas com glicerina em PBS (v/v) para a análise no microscópio de fluorescência *Olympus BX51* (Olympus Co, Tokyo, Japan).

3.2.2. Histomorfometria das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ na derme papilar e reticular, capilares e vasos da pele

A análise histomorfométrica foi realizada para quantificar as cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ nas regiões da derme papilar e reticular, capilares e vasos da pele de pacientes e controles, por meio de um sistema de análise de imagens. O sistema consiste de uma câmera fotográfica CCD Sony, acoplada a um microscópio *Olympus BX51* (Olympus Co, Tokyo, Japan), que captura as imagens e as envia para o monitor por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada). As imagens foram processadas pelo *software Image Pro-Plus 6.0*. A análise foi realizada por observador, às cegas, sendo adquiridas aleatoriamente duas imagens de cada caso, num aumento de 400 vezes, e demarcados cinco campos por imagem da derme papilar (**Figura 17**), derme reticular (**Figura 18**), capilares e vasos (**Figura 19**). A área de cada campo analisado foi medida em μm^2 , utilizando-se os recursos do *software Image Pro-Plus 6.0* de seleção de cores; a tonalidade verde fluorescente, que identifica as cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, foi quantificada. A média da área imunomarcada correspondente às cadeias do colágeno V e foi dividida pela média da área total analisada e o resultado final expresso em porcentagem.

Figura 17. Ilustração representativa da avaliação das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ da derme papilar por análise de imagem. **A)** A linha em verde delimita a área analisada. **B)** Em vermelho, está demarcada a imunofluorescência correspondente às cadeias do colágeno V, quantificadas pelo *software Image Pro-Plus 6.0*.

Figura 18. Ilustração representativa da avaliação das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ da derme reticular por análise de imagem. A linha em verde delimita a área analisada e em vermelho está demarcada a imunofluorescência correspondente às cadeias do colágeno V, quantificadas pelo *software Image Pro-Plus 6.0*.

Figura 19. Ilustração representativa da análise das cadeias $\alpha_1(V)$ e $\alpha_2(V)$ dos vasos da pele por análise de imagem. **A)** a linha em verde delimita a área analisada; **B)** em vermelho, está demarcada a imunofluorescência correspondente às cadeias do colágeno V, quantificadas pelo *software Image Pro-Plus 6.0*.

3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

3.3.1. *Preparo do tecido para microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

Para a microscopia eletrônica de transmissão, os fragmentos de biópsia de pele foram fixados em solução de glutaraldeído a 2%, em tampão Fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2, por 60 minutos. Esse procedimento é seguido de pós-fixação em Tetróxido de ósmio 1%, dissolvido em 0,9% de Cloreto de sódio, por 60 minutos. O material fixado foi marcado em bloco, em Acetato de uranila aquosa, por 24 horas. Após esse procedimento, as amostras foram desidratadas em acetona e embebidas em resina Araldite. Cortes ultrafinos foram obtidos com uma faca de diamante em micrótomo LKB Ultratome (Leica, Deerfield, IL, EUA). Posteriormente, foram colocados em grelha de cobre (200-mesh; Ladd Research Industries, Burlington, VT, EUA) e contrastados com Acetato de uranila e Citrato de chumbo. Os espécimes foram micrografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 100cx 100KW

(Philips, Munich, Alemanha), operando a 80 kV.

3.2.2. Preparo do tecido para imunomarcação simples

Os fragmentos de biópsia de pele foram fixados em solução de glutaraldeído 2%, por 2 horas, à temperatura ambiente. Subsequentemente, eles foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e imersos em resina *LR White Resin* (*London Resin Company*), diluída 1:2 em etanol 70%, por 1 hora. Após três incubações consecutivas em resina *LR White Resin*, as amostras foram imersas em cápsulas de gelatina e cobertas com a resina até a borda, sendo mantidas a 60°C, por 24 a 48 horas, para a polimerização e posterior realização dos cortes semifinos (2µm). Depois da coloração com Azul de Toluidina, para verificar a preservação do padrão histológico, as amostras foram seccionadas em cortes ultrafinos, com 50nm de espessura, e inseridas em tela de níquel.

3.3.3. Imunolocalização simples com ouro coloidal

Para a imunolocalização ultraestrutural indireta por marcação simples, os cortes ultrafinos, com 50nm de espessura, de pele de pacientes com ES e controles, inseridos em tela de níquel, foram hidratados em água ultrapura, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com tampão salino Tris (TBS) e Glicina 0,02M, pH 7,4, para bloqueio de aldeídos livres; já para bloqueio de sítios antigênicos inespecíficos, soro normal de cabra foi diluído 1:1 em PBS 3% BSA 0,1%, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados, por 12 horas, a 4°C, com anticorpos policlonais anti- $\alpha 1(V)$ de camundongo¹⁴⁷ e anti- $\alpha 2(V)$ de coelho (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), diluídos em TBS/BSA 0,1% e Tween₂₀ 0,05%, pH 7,4, na concentração de 1:300 e 1:50, respectivamente. Após esse período, foi realizado um ciclo de três lavagens com TBS/BSA 0,1% com Tween₂₀ 0,05%, pH 8,2, por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada incubação com anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho conjugados com ouro coloidal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), diluídos em NaCl 0,5M/BSA 0,1% com Tween₂₀ 0,05%, pH 8,0,

por duas horas, à temperatura ambiente, na concentração de 1:50. Após ciclo de três lavagens, de 3 minutos, com TBS/BSA 0,1% com Tween₂₀ 0,05%, pH 8,0, foi realizada a fixação dos cortes em glutaraldeído 2,5%, diluído em tampão Cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Depois da fixação, os cortes foram lavados em água destilada, por 10 minutos, e contracolorados com Acetato de uranila e nitrato de chumbo, por 5 minutos cada. Por fim, os cortes imunomarcados com ouro coloidal em tela de níquel foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100cx 100KW (Philips, Munich, Alemanha).

3.4. CULTURA DE CÉLULAS

3.4.1. Cultura Primária de Fibroblasto

A cultura primária de fibroblasto da biópsia de pele de pacientes com ES e controles foi realizada pelo método de “*explant*”. Fragmentos de pele, com cerca de 1mm, foram cultivados em garrafas de 75cm² em meio DMEM, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Streptomicina, em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Após a confluência 100% de células (1x10⁶), essas foram tratadas com solução de Tripsina-EDTA 0,05% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), para a realização de repiques. Fibroblastos foram cultivados sobre lamínulas, em placas de 24 poços, para análise morfológica. Para quantificação de proteína total, fibroblastos foram cultivados em garrafas de 75cm². Por último, foram cultivados fibroblastos em placas de 6 poços para a realização do silenciamento gênico temporário.

3.4.2. Reconstrução Tridimensional em Microscópio Confocal

Para avaliação da morfologia, distribuição e interação das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, fibroblastos de pacientes com ES e controles foram cultivados sobre lamínulas, em placas de 24 poços, até atingirem confluência de aproximadamente 80%. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS, por 1 hora, a 4°C. Após um ciclo de três lavagens com PBS, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com BSA 5%

em PBS, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Na sequência, os anticorpos policlonais de camundongo anticadeia $\alpha 1(V)$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e de coelho anticadeia $\alpha 2(V)$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), diluídos 1:300 e 1:80 em PBS, respectivamente, foram incubados, durante a noite, a 4°C. Para a confirmação do fenótipo celular, as células foram incubadas com anticorpo antivimentina (1:50), proteína do citoesqueleto dos fibroblastos, nas mesmas condições (**Figura 20**). Após outro ciclo de lavagens com PBS/Tween₂₀ 0,05%, os anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo (Alexa Fluor 488; Invitrogen Life Technologies) e anti-IgG de coelho (Alexa Fluor 546; Invitrogen Life Technologies), diluídos 1:300 em PBS, foram incubados por três horas, à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS/Tween₂₀ 0,05%, o núcleo dos fibroblastos foi marcado com 4'-6-Diamidino-2-phenylcinodole (DAPI; Invitrogen), diluído 1:200 em PBS, por incubação de 15 minutos. Finalmente, as lamínulas foram montadas em lâminas com tampão glicerina em PBS (v/v) e analisadas em microscópio confocal (Zeiss LSM 510 META/UV, Germany).

Figura 20. Identificação dos fibroblastos. Células cultivadas a partir de fragmentos de biópsias de pele de pacientes com ES e controles foram identificadas como fibroblastos devido à sua morfologia característica e pela imunomarcação positiva para vimentina, proteína do citoesqueleto dos fibroblastos, visualizada em verde fluorescente. Aumento 200x.

3.5. SUPRESSÃO TEMPORÁRIA DA EXPRESSÃO DO GENE COL5A2

3.5.1. Ensaio com siRNA temporário em cultura de fibroblastos

Fibroblastos foram cultivados em triplicatas, em placas de 6 poços, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), com uma confluência de aproximadamente 1×10^2 células. Os poços foram lavados com PBS e com meio OPTIMEN (Invitrogen, Life Technologies) para retirada total do SFB.

3.5.2. Transfecção do siRNA anti-COL5A2

Os fibroblastos foram transfectados com a sequência de siRNA contra RNAm do gene COL5A2 (TriFECTa™ kit, Integrated DNA Technologies – IDT), utilizando-se de lipídios catiônicos (Lipofectamine 2000- Invitrogen) (**Figura 21**), os quais criam uma interferência instável na célula. Foram testadas três sequências de *primers* (duplex) para esse gene. Como controle negativo, foi utilizado siRNA sintetizado a partir de uma sequência irrelevante (DS *Scrambled Negative*), sem homologia com genes de humanos, e como controle positivo da metodologia, foi utilizado siRNA HPRT-S1, comumente encontrado em gene humano, de acordo com protocolo do fabricante.

As placas com fibroblastos transfectados foram mantidas por 72 horas em estufa, a 37°C, e atmosfera de 5% de CO₂. Ao final desse período, o RNAm foi extraído para análise em PCR em tempo real. Para a escolha do melhor duplex para inibir o COL5A2, assim como para controlar a eficiência de transfecção, procedeu-se à transfecção dos fibroblastos com os três duplex e, após 24h, as células foram marcadas com TYE™ 56DS Fluorescente, realizando-se também a análise de qPCR-RT, como descrito acima.

Figura 21. Fibroblastos transfectados com a sequência de siRNA contra o gene COL5A2. A seta mostra a eficiência da transfecção e a marcação dos fibroblastos com TYE™ 56DS Fluorescente.

3.5.3. *Extração de RNAm de fibroblastos*

Para a análise da expressão dos genes COL5A1 e COL5A2, fibroblastos da pele de controles e pacientes com ES foram cultivados em garrafas de 75cm³. Após confluência de 100% dessas células, o RNA total foi extraído pelo método de Chomezynski e Sacchi, ¹⁴⁸ utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a separação do RNA, após adição de 200µl de clorofórmio, as amostras foram rapidamente agitadas, mantidas à temperatura ambiente, por 3 minutos, e submetidas à centrifugação (12.000 rpm), por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para outro tubo de plástico. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 500µl de álcool isopropílico às amostras, as quais foram homogeneizadas por inversão e mantidas no freezer a -20°C, por um período de 12 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm), por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA diluído em 1ml de etanol (85%) e submetido a nova centrifugação (5 minutos/2.500 rpm/ 4°C). Por fim, o RNA foi dissolvido em 20µl de H₂O deionizada, tratada com dietilpirocarbonato (DEPEC; Merck, Alemanha), um forte inibidor de ribonucleases. A avaliação da concentração e

grau de pureza das amostras de RNA foi realizada em espectrofotômetro (Nano Vueplus; GE). Para a obtenção de RNA com alto grau de pureza, a relação entre as leituras obtidas nos comprimentos de onda 260nm e 280nm deve estar entre 1.7 e 2.0.

3.5.4. Análise de expressão gênica por qRT-PCR

Para a reação de qRT-PCR, foram selecionados 5 genes de interesse, ACTB (beta actina), COL5A1 (colágeno V alfa 1), COL5A2 (colágeno V alfa 2), ITGA2 (integrina alfa 2, beta 1), TGFB1 (TGF beta 1), específicos para humanos (**Tabela 3**). As sequências dos genes foram adquiridas pelo site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. Para a montagem do mapa gênico da sequência escolhida, foi utilizado o *software* localizado no endereço eletrônico www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgbeat.

Tabela 3. Sequência de Oligonucleotídeos.

Gene	Sense 3' – 5'	Antisense 5' – 3'	Pares de base (pb)
ACTB	AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC	AGA GGC GTA CAG GGA TAG CA	175
COL5A1	GTG GCA CAG AAT TGC TCT CA	CTG GAT GTC ACC CTC AAA CA	175
COL5A2	GGA AAT GTG GGC AAG ACT GT	TTG ATG GTG GTG CTC ATT GT	169
ITGA2	AAG CCG AAG TAC CAA CAG GA	TGA GCT CTG TGG TCT CAT CA	159
TGFB1	CCC TGG ACA CCA ACT ATT GC	GTC CAG GCT CCA AAT GTA GG	100

A expressão dos genes foi avaliada por PCR em tempo real, utilizando-se o equipamento Step One (Applied Biosystems – Foster City, CA – USA) com o kit Super Script III Platinum SYBR Green® One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Life Technologies).

Cada reação foi realizada com 15µl de volume total, contendo 1,45µl de água deionizada estéril; 7,5µl da mistura de reação 2xSYBER Green®; 0,3µl de cada *primer* a 10nM; 0,3µl de Super Script III RT/Platinum Taq Mix; 0,15µl de ROX Refence Dye e 5µl de RNA total a 20ng/ml de cada amostra. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra).

A expressão diferencial dos transcritos alvos foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno ou gene normatizador, no caso, a β -actina. A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde: CT = ciclo de início de quantificação do transcrito; ΔCT = CT do gene de interesse menos o CT do gene referência; $\Delta\Delta CT$ = ΔCT médio da amostra de interesse menos ΔCT médio da amostra referência. Para a análise de expressão gênica relativa, amostras de tecido normal foram utilizadas como referência.

As reações de qRT-PCR foram padronizadas com o intuito de encontrar a melhor temperatura de anelamento para cada gene em estudo. Dessa forma, um único pico de fluorescência foi detectado para cada gene. Os tamanhos dos fragmentos gerados pelo qRT-PCR foram conferidos em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo, como mostrado na **Figura 22**.

Figura 22. Imagem ilustrativa do produto de PCR após reação de qRT-PCR em gel de agarose 2%.

As condições de ciclagem para todos os genes foram as seguintes: 50°C, por 10 minutos (para síntese de cDNA), seguido de 40 ciclos de 95°C, por 15 segundos, 60°C, por 30 segundos, e 72°C, por 30 segundos. Foi realizada curva de *melting* (fusão) de

cada gene, para verificação e certificação de um único pico de fluorescência das cada amostra analisada.

3.5.5. Reconstrução em 3D das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ após transfecção

Para a microscopia confocal, os fibroblastos foram cultivados em lamínulas. Após protocolo da transfecção do siRNA anti-COL5A2, as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, por 1 hora, a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com leite desnatado 5% em PBS, por 30 minutos, à temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios inespecíficos. A dupla marcação das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ foi realizada mediante a adição dos anticorpos policlonais de camundongo anti- $\alpha 1(V)$ (1:400) e de coelho anti- $\alpha 2(V)$ (1:200) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), diluídos em PBS. As reações foram incubadas durante a noite, a 4°C. Após outro ciclo de lavagens com PBS/Tween₂₀ 0,05%, foram adicionados os anticorpos de cabra anti-IgG de coelho (Alexa Fluor 546; Invitrogen Life Technology) e anti-IgG de camundongo (Alexa Fluor 488; Invitrogen Life Technology), na diluição de 1:300 em PBS, por 3 horas, à temperatura ambiente. Na sequência, as lamínulas foram lavadas com PBS/Tween₂₀ 0,05% e incubadas com o 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen Life Technology), diluído em PBS, por 15 minutos, para coloração da cromatina nuclear. Finalmente, as lamínulas foram lavadas com PBS/Tween₂₀ 0,05%, montadas com tampão glicerina em PBS (v/v) e analisadas em microscópio confocal (Zeiss LSM 510 META/UV, Germany).

3.6. EXTRAÇÃO PROTEICA DA CULTURA DE FIBROBLASTOS

Para a extração proteica, os fibroblastos foram lisados com 200µl do tampão de lise celular (Tris 25mM, EDTA 1mM, Triton x-100 0,1%, PMSF 1mM, pH 7,4). O lisado celular foi centrifugado a 15.600xg, a 4°C, por 10 minutos. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando-se o método de Lowry. A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas (Bio-RAD®).

3.6.1. Gel de Poliacrilamida e Western Blot

As amostras de extratos proteicos (30µg) tratadas com tampão contendo o agente redutor Ditioneitol (DTT; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), por 5 minutos, a 100°C, foram separadas de acordo com o seu peso molecular, em gel de poliacrilamida 10%, contendo Tris 1,5mM, pH 8,8, Persulfato de Amônio 10% (APS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e Tetra Metilenodiamina (Temed, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sob corrente elétrica de 100 *Volts*, durante 120 minutos. Em seguida, os extratos proteicos separados foram eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em tampão Tris 25mM, pH 8,8, e metanol 20%, por 90 minutos, com 100 *Volts*.

Para a realização do *Western Blot*, a membrana teve seus sítios inespecíficos bloqueados com albumina bovina (BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 5% e Tween₂₀ 0,2% em PBS, durante 90 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos policlonais de camundongo anticadeia $\alpha 1(V)$ e de coelho anticadeia $\alpha 2(V)$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), diluídos 1:1000 e 1:500, respectivamente, em BSA1% e Tween₂₀ 0,1% em PBS, foram incubados por uma hora a temperatura ambiente, sob agitação. O anticorpo anti- β -actina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído 1:2000 em BSA1% e Tween₂₀ 0,1% em PBS, foi utilizado para identificar a β -actina, uma proteína constitutiva da célula e utilizada como controle interno. Após lavagens com PBS/Tween₂₀ 0,1%, as membranas foram reveladas com o kit ECL PlusTM (Amersham Biosciences), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão, abrangendo o valor mínimo e o valor máximo observados. Foram realizados dois testes estatísticos, um para determinação de normalidade das amostras e um para correlação entre médias variáveis. Através do tipo de correlação, os resultados foram expressos em mediana e intervalo, abrangendo os valores mínimo e máximo observados. Para a indicação de distribuição normal, foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* e, após confirmação de normalidade, foi aplicado o teste *t-student* para comparação entre as médias de duas variáveis.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES

A **Tabela 4** mostra as principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes e indivíduos controle-saudáveis avaliadas neste estudo. Não houve diferença significativa entre as características dos doadores das respectivas amostras de pele da análise histológica e da cultura de fibroblastos. A seguir, na descrição de nossos resultados, vamos nos referir aos indivíduos controle-saudáveis somente como controles.

Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes.

Características Clínicas e Laboratoriais	Resultado
N (%)	7 (100%)
Idade, desvio padrão (variação)	42 (12)
Sexo, N (%)	Feminino, 4 (60%) ¹ ; Masculino, 3 (40%)
Forma limitada e difusa, N (%)	Limitada 3, (40%); Difusa, 4 (60%)
Doença precoce; ¹ Duração, mediana (variação)	12 (14-24 meses)
MRSS, mediana (variação)	25 (11-40)
Índice de atividade de Valentini, ² mediana (variação)	0,5
FAN +, N (%)	7 (100%)
Anti-Scl70 +, N (%)	2 (28,7%)
Anticentrômero +, N (%)	4(51%)

1. Escore de Rodnan Modificado

2. de acordo com o índice de atividade de Valentini ^{143,144}

Em relação ao diagnóstico histológico dos pacientes, todos apresentavam fibrose leve (100%).

4.2. REMODELAMENTO DA PELE NA ESCLERODERMIA

4.2.1. Alterações Estruturais do Tecido Cutâneo

Na **Figura 23 (Painéis A-B)**, observam-se as estruturas microscópicas da pele dos controles e de pacientes com ES, coradas pela Hematoxilina e Eosina. A pele controle (**Figura 23, Painel A**) exibe epiderme preservada e camada córnea evidente. Por outro lado, a derme papilar mostra um tecido conjuntivo frouxo com matriz fibrilar homogênea, corada pelo H&E em rosa-claro, logo abaixo da epiderme. Na derme reticular das peles controle, identificamos a presença de tecido conjuntivo denso com anexos cutâneos, caracterizado pela ocupação de densas fibras de colágeno, capilares, vasos, glândulas e bulbo de folículos pilosos, em toda sua extensão, de aspecto normal.

Esse padrão é totalmente alterado (**Figura 23, Painel B**) nos pacientes com ES, onde se observa espessamento e retificação da epiderme, evidenciada pela intensa impregnação do corante nessas biópsias. Na epiderme dos pacientes com ES, nota-se projeções das papilas dérmicas em direção à derme papilar, com aumento da coloração rósea escura nessa região. A derme papilar dos pacientes apresenta-se mais espessa, com tênue infiltrado inflamatório e fibras colágenas coradas em rosa mais intenso, quando comparadas à pele controle. Na derme reticular, esse padrão se intensifica até a região mais profunda, que é associada à atrofia dos anexos cutâneos, característica da pele desses pacientes.

Em biópsias de pele coradas pelo Tricrômico de Masson (**Figura 23, Painéis C-D**), na região dermo-epidérmica dos controles (**Figura 23, Painel C**), observa-se o colágeno em azul, de aspecto retilíneo, acompanhando a região da membrana basal, estendendo-se até a derme papilar, ao redor dos vasos e anexos cutâneos. Nota-se em toda a derme papilar das peles controle uma trama de fibras de colágeno, resultando em um padrão frouxo e homogêneo e fibras colágenas mais densas da derme reticular. A identificação da derme papilar e reticular nos controles apresenta-se nítida nessa coloração, caracterizando uma distribuição das fibras de colágeno heterogênea na pele. Na região mais profunda das peles controle, observa-se o tecido adiposo entremeado por fibras de colágeno de aspecto arroxeadado pelo Tricrômico de Masson, caracterizado pela presença de fibras colágenas mais densas nessa região.

Por outro lado, na pele dos pacientes na **Figura 23 (Painel D)**, observa-se que o colágeno da região dermo-epidérmica torna-se roxo-avermelhado, identificado pelo Tricrômico de Masson, caracterizando aumento na densidade dessas fibras. Ainda, o remodelamento do colágeno é evidente, mostrando na região dermo-epidérmica a nítida mudança do padrão retilíneo e o desaparecimento da demarcação fibrilar nos pacientes com ES, em relação à pele dos controles saudáveis. Observa-se também espessamento da derme papilar e da reticular à custa do depósito de colágeno, assim como o aprisionamento dos anexos cutâneos, evidenciando um padrão histológico típico da pele de pacientes com ES.

Figura 23. Cortes transversais da pele dos controles e de pacientes com ES, coradas com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson. Notar a pele controle em (A) epiderme (Epi) e camada córnea preservadas, mostrando um aspecto histológico normal. A derme papilar (DP) da pele controle mostra a matriz fibrilar homogênea, corada em rosa-claro. Na derme reticular das peles controle, identificamos os anexos cutâneos (Anex) e fibras de colágeno, em toda sua extensão, de aspecto normal. Na pele dos pacientes com ES, (B) notar o espessamento e retificação da epiderme (Epi) e intensa impregnação do corante. Na epiderme dos pacientes com ES, notar projeções das papilas dérmicas em direção à derme papilar e espessamento das fibras. Na derme

reticular aumenta o depósito de colágeno e os anexos cutâneos diminuem (Anex). Nas peles controle coradas pelo Tricrômico de Masson (C) identifica-se na derme papilar (DP) o colágeno em azul acompanhando a epiderme, ao redor dos vasos e anexos cutâneos (Anex). Em contraste, na derme papilar (DP) dos pacientes o colágeno (D) é intensamente remodelado se estendendo até a derme reticular (DR) e a profunda. Aumento:200X

4.2.2. Distribuição e Quantificação das Cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ no Tecido Cutâneo

As **Figuras 24, 25 e 26** ilustram os resultados da expressão das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ nas biópsias das peles controle e de pacientes com ES, imunomarcadas por fluorescência e reconstruídos em 3D, por microscopia confocal.

Pôde-se identificar que a cadeia $\alpha 1(V)$ na pele controle está localizada na região dermo-epidérmica, acompanhando a membrana basal e estendendo-se até a derme papilar (**Figura 24, Painel A**), onde sua expressão habitual é evidente, já nos vasos e capilares da derme reticular sua expressão é tênue, mantendo a proporção normal do colágeno tipo V na derme sadia (**Figura 24, Painel C**). Todavia, na biópsia de pele de paciente com ES, observa-se que apesar da manutenção na expressão da cadeia $\alpha 1(V)$ em vasos e capilares, há uma inversão de sua proporção nas camadas da derme, confirmada com o decréscimo acentuado de sua expressão na derme papilar ($p < 0,0001$) (**Figura 24B, Tabela 5; Gráfico 1**) e aumento significativo na derme reticular ($p = 0,001$), quando comparado ao controle (**Figura 24, Painel D; Tabela 5; Gráfico 2**). Esses dados corroboram com os resultados morfológicos obtidos através de Tricrômico de Masson da pele controle, que mostra nessa região o colágeno de aspecto retilíneo, o qual se estende até a derme papilar, ao redor dos vasos e anexos cutâneos (**Figura 23, Painel C**).

A **Figura 25** ilustra os resultados da expressão das cadeias $\alpha 2(V)$ nas biópsias das peles controle e de pacientes com ES, identificadas com imunofluorescência e reconstituídas em 3D, por microscopia confocal. De maneira geral, é possível observar a distribuição normal da cadeia $\alpha 2(V)$ no controle, sendo sua expressão quase ausente na derme papilar e com padrão linear e fino na derme reticular, principalmente em vasos e capilares (**Figura 25, Painéis A e C**). Em contrapartida, na derme de pacientes com ES, nota-se distribuição anormal da cadeia $\alpha 2(V)$, ratificada com superexpressão na derme reticular ($p < 0,0001$), assim como em pequenos vasos ($p < 0,0001$) e capilares ($p <$

0,0001), quando comparada ao controle (**Figura 25, Painéis B e D; Tabela 5; Gráfico 2, 3 e 4**).

Na **Figura 26 (Painéis A e B)**, observam-se os resultados da imunomarcção dupla das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ nas biópsias das peles controle e de pacientes com ES, após reconstituição em 3D, em microscópio confocal. No **Painel A**, é possível observar que a imunomarcção da cadeia $\alpha 1(V)$ segue um padrão homogêneo, delineando a região da membrana basal da derme papilar, caracterizada pela imunofluorescência em verde e a ausência da imunomarcção da cadeia $\alpha 2(V)$, em laranja, nas peles controle.

Em contraste, no grupo ES (**Figura 26, Painel B**), nota-se uma tênue expressão da cadeia $\alpha 1(V)$ na derme papilar e aumento da $\alpha 2(V)$, principalmente em vasos e capilares da derme reticular.

Figura 24. Reconstrução 3D da imunomarcagem da cadeia $\alpha 1(V)$ na derme papilar e reticular de controles e pacientes com ES. Nota-se em verde expressão normal da cadeia $\alpha 1(V)$ na derme papilar das peles controles em contraste com sua acentuada diminuição na pele dos pacientes com ES (B). Na derme reticular das peles controles em (C) observa-se a presença desta cadeia obedecendo a um padrão homogêneo e pouco expresso. Entretanto, na derme reticular dos pacientes observa-se intensa e significativa fluorescência (verde) com padrão anormal e heterogêneo (D). (Aumento de 200X).

Figura 25. Reconstrução 3D da imunomarcagem da cadeia $\alpha 2(V)$ na derme papilar e reticular de biópsias de controles e pacientes com ES (A-D). Nota-se em (B), na derme papilar da pele de pacientes com ES, expressão normal da cadeia $\alpha 2(V)$, caracterizada pela imunomarcagem em verde, comparado com as peles controle (A). Na derme reticular das peles dos pacientes com ES (D), ficou evidenciada intensa fluorescência da cadeia $\alpha 2(V)$ na parede dos vasos e capilares, quando comparada às peles controle (C) (Aumento de 200X).

$\alpha 1(V)$ Verde / $\alpha 2(V)$ Laranja

Figura 26. Reconstrução 3D da imunomarcagem dupla em microscópio confocal das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, das biópsias das peles controle e de pacientes com ES. Notar em (A) a imunomarcagem da cadeia $\alpha 1(V)$ (verde), delineando a região da membrana basal da derme papilar, ausência da imunomarcagem da cadeia $\alpha 2(V)$, em laranja, nas peles controle. Nas peles de pacientes com ES (B), nota-se uma tênue expressão da cadeia $\alpha 1(V)$ na derme papilar e aumento da $\alpha 2(V)$, principalmente em vasos e capilares da derme reticular.

Tabela 5. Quantificação da expressão das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno V nas biópsias de pele dos grupos controle e pacientes com ES.

Regiões e estruturas da pele	Cadeia do colágeno V	Controle	Pacientes ES
Derme papilar	$\alpha 1(V)$	66,84 $\pm$ 3,36	12,77 $\pm$ 1,344*
	$\alpha 2(V)$	1,234 $\pm$ 0,075	1,044 $\pm$ 0,58
Derme reticular	$\alpha 1(V)$	7,657 $\pm$ 0,2133	13,75 $\pm$ 0,958 **
	$\alpha 2(V)$	5,072 $\pm$ 0,4117	21,07 $\pm$ 0,790*
Capilares	$\alpha 1(V)$	24,15 $\pm$ 7,702	31,64 $\pm$ 8,024
	$\alpha 2(V)$	15,11 $\pm$ 3,804	60,88 $\pm$ 5,817*
Vasos	$\alpha 1(V)$	24,15 $\pm$ 7,702	21,98 $\pm$ 4,432
	$\alpha 2(V)$	12,16 $\pm$ 0,8105	63,18 $\pm$ 3,563*

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Significância estatística com T-test: $p < 0,001$ (*); $p = 0,001$ (**)

Gráfico 1: Expressão das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V na derme papilar do grupo controle e pacientes com ES em porcentagem. T-test: $p < 0,0001$ (*).

Gráfico 2: Expressão das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V na derme reticular do grupo controle e pacientes com ES em porcentagem. T-test: $p < 0,0001$ (*) e $p = 0.001$ (**).

Gráfico 3: Expressão das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V nos capilares da pele do grupo controle e pacientes com ES em porcentagem. T-test: $p < 0,0001$ (*).

Gráfico 4: Expressão das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo V nos vasos da pele do grupo controle e pacientes com ES em porcentagem. T-test: $p < 0,0001$ (*).

4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

4.3.1. Alterações Ultraestruturais do Tecido Cutâneo

Nas **figuras 27, 28 e 29** pode-se visualizar a estrutura submicroscópica da pele dos controles e pacientes com ES. Em menor aumento, a pele controle (**Figura 27, Painei A**) exibe arquitetura preservada da epiderme, composta por queratinócitos ao longo da lâmina basal íntegra. Nota-se nítida demarcação entre a lâmina basal e a derme papilar, assim como entre a derme papilar e a reticular (**Figura 27, Painei A**). Na **Figura 28 (Painei A)** e **Figura 29 (Painei A)**, pode-se observar a pele controle em grande aumento. Nota-se distribuição homogênea das fibras do colágeno ao longo da lâmina basal, destacando-se das fibras finas da derme papilar e reticular. Na **Figura 30 (Painei A)**, observa-se a disposição das fibras grossas em distribuição harmônica e regular. Em contraste, em menor aumento (**Figura 27, Painei B**), a pele de pacientes com ES exibe retificação da epiderme e fusão da lâmina basal com a derme papilar. Em maior aumento (**Figura 28, Painei B; Figura 29, Painei B**), essas regiões exibem desarranjo e proeminência das fibras finas do colágeno, determinando um espessamento significativo da derme reticular. Na **Figura 30 (Painei A)**, notamos que a derme profunda mantém o padrão regular de fibras grossas de colágeno.

Na **Figura 29 (Painéis A e B)** e na **Figura 30 (Painéis A e B)** estão representadas em destaque a distribuição da imunoexpressão para cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ na derme papilar, reticular e profunda. Na pele controle há nitidez da imunoexpressão da cadeia $\alpha 1(V)$ ao longo da junção entre a lâmina basal e a derme papilar, com tênue expressão da cadeia $\alpha 2(V)$ (**Figura 29, Painéis Aa, Ab**). Na derme profunda da pele controle, observa-se discreta expressão das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ (**Figura 30, Painéis Aa, Ab**). Em contraste, na pele de pacientes portadores de ES, há forte imunoexpressão das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, com uma maior evidência da cadeia $\alpha 2(V)$ na região espessada pela junção lâmina basal e derme reticular (**Figura 29, Painéis Ba, Bb**). Na derme profunda, observa-se forte imunoexpressão das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ em pacientes com ES (**Figura 30, Painéis Ba, Bb**).

Figura 27. Micrografias eletrônicas de pele humana (A-B). Em A nota-se a pele controle com arquitetura preservada da epiderme (Ep) e queratinocitos (Qr) distribuídos ao longo da lâmina basal íntegra (LB); nota-se nítida demarcação entre a lâmina basal (LB) e a derme papilar (DP), assim como entre a derme papilar (DP) e reticular (DR). Em B observa-se na pele de pacientes com SSc retificação da epiderme e fusão da lâmina basal (LB) com a derme papilar (DP), coincidente com desarranjo e proeminência das fibras finas do colágeno (Col) e espessamento da derme reticular (DR) (setas). **Barra de Aumento= 5 μ m**

Figura 28. Micrografias eletrônicas de pele humana (A-B). Em A pode-se observar a pele controle em grande aumento. Nota-se distribuição homogênea das fibras do colágeno ao longo da lâmina basal, destacando-se das fibras finas da derme papilar e reticular. Em B nota-se regiões que exibem desarranjo e proeminência das fibras finas do colágeno, determinando um espessamento significativo da derme reticular em pele de pacientes com ES (setas). **Barra de Aumento= 1µm**

Figura 29. Micrografias eletrônicas de pele humana (A-B). Em A, observa-se a pele controle exibindo nitidez de imunexpressão da cadeia $\alpha1(V)$ ao longo da junção entre a lâmina basal e a derme papilar (DP) (Aa, Setas). Em Ab, há tênue expressão da cadeia $\alpha2(V)$ na derme papilar. Já em B (Ba e Bb), observa-se forte imunexpressão das cadeias $\alpha1(V)$ e $\alpha2(V)$, com maior evidência da cadeia $\alpha2(V)$ na região espessada pela junção lâmina basal e derme reticular. Barra de Aumento = 0,5 μm , 1 μm

Figura 30. Micrografias eletrônicas de pele humana (A-B). Em A, nota-se que a derme profunda (DPr) mantém o padrão regular das fibras grossas do colágeno (Col), destacando-se das fibras finas da derme papilar e reticular. Em em A, observa-se discreta imunoexpressão das cadeias $\alpha1(V)$ e $\alpha2(V)$ na derme profunda (DPr) na pele de controles (Aa e Bb, Setas), em contraste com forte imunoexpressão das cadeias $\alpha1(V)$ e $\alpha2(V)$ em pacientes com ES (Ba e Bb, setas) Barra de Aumento=1 μm

4.4. RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL (3D) EM FIBROBLASTO DE PELE

4.4.1 Reconstrução tridimensional das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ de fibroblastos dérmicos de controle e pacientes com ES

Foram realizados estudos *in vitro*, por meio de cultura de fibroblastos dérmicos de biópsias de peles de controles e pacientes com ES, para avaliar a histoarquitetura e a distribuição espacial das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ sem a interferência de componentes teciduais (**Figura 31**). Nos pacientes com ES, a cadeia $\alpha 1(V)$, imunomarcada em verde, aparece com intensa expressão em toda a célula, com acentuada produção pericelular, como ilustrado no **Painel B**, se contrapondo ao observado nos controles, os quais apresentam pouca expressão da cadeia $\alpha 1(V)$, como mostrado no **Painel A**. O mesmo padrão de intensa expressão da cadeia $\alpha 2(V)$, imunomarcada em laranja, é observado nos pacientes com ES, mostrando distribuição homogênea ao longo de todo citoplasma do fibroblasto (**Painel D**), quando comparado com o grupo controle, que se mostra pouco expresso (**Painel C**).

A dupla marcação das cadeias $\alpha 1$ (verde) e $\alpha 2$ (laranja) do colágeno tipo V evidenciou que nos pacientes com ES as cadeias formam agregados irregulares, assumindo arranjo filamentosos denso, com entrelaçamento anormal, além de uma relação desproporcional das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ na formação do colágeno tipo V (**Painel F**), contrastando com o que foi observado nos controles, onde é notório o entrelaçamento das cadeias seguindo o padrão normal de pouca expressão com filamentos lineares, tênues e pouco densos (**Painel E**).

Figura 31. Imunomarcacão de fibroblasto de pele de controle e paciente com ES. Células imunomarcadas com anticorpos anti- $\alpha 1(V)$ (ALEXA 488/verde) e anti- $\alpha 2(V)$ (ALEXA 546/laranja) e núcleos corados com DAPI. Em **A** e **C**, nota-se a manutenção da baixa expressão das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ nos fibroblastos de controle. Já em **B** e **D**, observa-se um grande aumento da expressão dessas cadeias nos fibroblastos de pacientes com ES. Na dupla marcação das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, de controles (**E**), nota-se menor frequência de positividade seguindo padrão habitual de entrelaçamento, com cadeias lineares e finas. Já em **F**, é observada uma acentuada produção das cadeias entrelaçadas, com arranjos filamentosos densos em protrusão ao redor do núcleo e pericelular. Aumento de 200x.

4.5. EXPRESSÃO DOS GENES COL5A1, COL5A2, ITGA2 E TGFB1

4.5.1. Expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 E TGFB1 obtidos da cultura de fibroblastos dérmicos

Para avaliar a expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 E TGFB1, fibroblastos dérmicos foram cultivados a partir de biópsias de pele de pacientes e controles, e a avaliação da expressão a partir do RNAm dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1 foi realizada por meio do qRT-PCR.

A expressão do gene COL5A1 apresentou-se maior, quando comparada com o grupo controle ($p = 0.01$); observou-se também aumento na expressão gênica do COL5A2 ($p = 0.002$) e ITGA2 ($p = 0.002$), como se vê no **Gráfico 5**. Não houve um aumento significativo do TGFB1, quando comparado com o grupo controle.

Na **Tabela 6**, podem ser vistos os valores das medianas e o intervalo abrangendo os valores máximos e mínimos observados no grupo controle e paciente, estudados para os diferentes genes.

Tabela 6. Quantidade relativa da expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1 de fibroblastos da pele dos grupos controle e pacientes com ES por qRT-PCR.

Genes	Controle	Pacientes ES
COL5A1	0,5385 $\pm$ 0,1004	2,073 $\pm$ 0,3123*
COL5A2	0,1865 $\pm$ 0,03126	1,401 $\pm$ 0,1504**
ITGA2	0,3539 $\pm$ 0,1157	0,9485 $\pm$ 0,02640*
TGF- β 1	2,139 $\pm$ 0,1194	1,750 $\pm$ 0,3926

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Significância estatística com T-test: $p = 0.01$ (*) e $p = 0.002$ (**)

Gráfico 5: Quantidade relativa da expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1 de fibroblastos da pele dos grupos controle e pacientes com ES por qRT-PCR T-test: T-test: $p = 0.01$ (*) e $p = 0.002$ (**).

4.6. IMMUNOBLOT DAS CADEIAS $\alpha 1(V)$ E $\alpha 2(V)$ EXTRAÍDAS DE FIBROBLASTOS DE PELE

Para verificar se o aumento da expressão gênica das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ resulta em aumento da expressão da proteína total foi realizado *imunoblot*.

A análise dos resultados mostrou menor proporção da cadeia $\alpha 1(V)$ produzida pelos fibroblastos de pele dos pacientes com ES em relação ao controle. Ao contrário a cadeia $\alpha 2(V)$ produzida pelos fibroblastos dérmicos de pacientes com ES apresentou maior proporção em relação ao controle. Foi possível a identificação das bandas peso molecular e utilização de anticorpos específicos anti- $\alpha 1(V)$ e anti- $\alpha 2(V)$ e β -actina.

Figura 32. *Immunoblot* das cadeias $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ e β -actina isolado da extração proteica de fibroblastos dérmicos de pacientes e controles. O imunoblot foi realizado a partir de 30 μ g de proteína total do lisado de fibroblastos de controles e pacientes com ES. **1)** Controle e **2)** Paciente com ES. **A)** Imunomarcagem da $\alpha 1(V)$, 280kd e β -actina, 43kd. **B)** Imunomarcagem da $\alpha 2(V)$ 275kd e β -actina, 43kd.

4.7. INIBIÇÃO DO COL5A2

4.7.1 Reconstrução tridimensional após inibição temporária do COL5A2

Com o objetivo de esclarecer a influência da cadeia $\alpha 1(V)$ na fibrilogênese do colágeno tipo V, procedeu-se à inibição do COL5A2, por silenciamento temporário desse gene em fibroblasto de pele de pacientes com ES. Dessa forma, utilizaram-se sequências dsRNA de 25 nucleotídeos, quimicamente sintetizadas, e substratos da Dicer, contendo como alvo o COL5A2. Também foi incluído nesse ensaio um controle universal Scrambled, non-silencing de 25 nucleotídeos. Para se proceder à escolha do melhor duplex para inibir o COL5A2, assim como para controlar a eficiência de transfecção, realizou-se a transfecção dos fibroblastos com os três duplex e, após 24h, as células foram marcadas com TYETM 56DS Fluorescente, onde se observou transfecção de 99% das células do duplex 3. A inibição do COL5A2 foi avaliada por qPCR-RT, onde ficou evidenciada uma inibição de mais de 90% do duplex 3, quando comparada com as células controle. Dessa forma, foi escolhido o duplex 3 para o estudo da inibição do COL5A2.

Foram realizados estudos *in vitro* por meio de cultura de fibroblastos dérmicos de controle e pacientes com ES. A reconstrução tridimensional foi realizada para avaliar a histoarquitetura e a distribuição espacial das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ sem a interferência de componentes teciduais após inibição temporária do COL5A2.

Nos fibroblastos dérmicos de pacientes com ES, a cadeia $\alpha 1(V)$ exibiu um padrão de expressão mais intenso com arranjos filamentosos densos de fibras

intracitoplasmática, como demonstrado na **Figura 33 (Painel A)**; essa cadeia demonstra ter sofrido uma diminuição em sua expressão, após inibição temporária do COL5A2, como pode ser observado na **Figura 33 (Painel C)**, caracterizada por um padrão de fibras finas distribuídas ao longo de toda a célula. Já a cadeia $\alpha 2(V)$ mostra-se presente e intensa, principalmente, ao redor do núcleo e região pericelular, além de ter sua distribuição por todo o citoplasma de maneira intensa em fibroblastos de pacientes com ES, como pode ser observado na **Figura 33(Painel B)**; como esperado após inibição temporária do COL5A2, fibroblastos apresentam-se com expressão diminuída da cadeia $\alpha 2(V)$, **Figura 33 (Painel D)**.

Figura 33. Inibição do gene COL5A2 em fibroblastos de pele de pacientes com ES. Células imunomarcadas com anticorpos anti- $\alpha1(V)$ (Alexa 488/verde) e anti- $\alpha2(V)$ (Alexa 546/laranja) e núcleos corados com DAPI. Em **A** e **B** observa-se a imunomarcagem acentuada das cadeias $\alpha1(V)$ e $\alpha2(V)$ nos fibroblastos de pacientes com ES. Após inibição do gene COL5A2, observa-se em **C** uma diminuição da $\alpha1(V)$ e $\alpha2(V)$. Notar aumento de 200x.

4.7.2 Expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 E TGFβ1 após inibição do COL5A2

O RNAm total foi extraído de fibroblastos dérmicos, cultivados a partir de biópsias de pele de pacientes após inibição temporária do gene COL5A2. Por meio da metodologia de qRT-PCR, foi analisada a expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFβ1 e comparados com a expressão gênica dos mesmos pacientes sem inibição do COL5A2.

A expressão do gene COL5A1 não apresentou aumento significativo em sua expressão após inibição COL5A2. Como esperado, observa-se uma diminuição significativa da expressão do gene COL5A2 ($p = 0.0001$). O gene ITGA2 mostra um aumento significativo em sua expressão ($p = 0.0002$) após o silenciamento do gene COL5A2. Não foram observadas alterações na expressão do gene TGFβ1, como ilustrado no **Gráfico 6**.

Na **Tabela 7**, podem ser vistos os valores das medianas e o intervalo abrangendo os valores máximos e mínimos observados no grupo de paciente, e pacientes após silenciamento temporário do gene COL5A2, estudados para os diferentes genes.

Tabela 7. Quantidade relativa da expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFβ1 após inibição do COL5A2 em fibroblastos de pacientes com ES por qRT-PCR.

Genes	Pacientes ES	Pacientes ES com siRNA COL5A2
COL5A1	1,593 ± 0,4271	2,239 ± 0,2433
COL5A2	1,401 ± 0,1504	0,1948 ± 0,0182*
ITGA2	0,6818 ± 0,1432	20,84 ± 3,469**
TGFB1	1,916 ± 0,3183	2,388 ± 0,3083

Valores representam a média ± desvio padrão. Significância estatística com T-test: $p = 0.0001$ (*) e $p = 0.0002$ (**)

Gráfico 6 Quantidade relativa da expressão dos genes COL5A1, COL5A2, ITGA2 e TGFB1 após inibição do COL5A2 em fibroblastos de pacientes com ES por qRT-PCR. T-test: $p = 0.0001$ (*) e $p = 0.0002$ (**)

5. DISCUSSÃO

A fibrose é a principal característica da doença autoimune conhecida como esclerose sistêmica ou esclerodermia (ES). No presente estudo, foi demonstrado que a distribuição anormal das cadeias α do colágeno do tipo V pode explicar parte do comprometimento cutâneo presente nos pacientes com ES.

É de consenso na literatura, que o remodelamento cutâneo na ES é resultante da intensa síntese do COLI e COLIII durante a evolução da doença.^{149,70} Porém estudos recentes realizados pelo nosso grupo mostraram que, principalmente nos estágios iniciais da doença, a pele dos pacientes apresentava distorção do seu padrão fibrilar e aumento da síntese do COLV, sendo este o primeiro a ter sua expressão aumentada na pele.⁸⁰

Martin e col (2012), demonstram que o aumento do COLV está relacionado com a atividade da ES nos estágios iniciais. Além disso, o aumento de COLV também foi observado no septo alveolar e na parede das artérias pré-acinares em biópsia de pulmão de pacientes com ES,^{133,134} confirmando a hipótese que o COLV é uma importante molécula que regula o diâmetro das fibras heterotípicas, e a sua modificação, qualitativa e/ou quantitativa, pode interferir no processo da fibrilogênese.^{129,150}

No presente trabalho foi demonstrado que há uma relação entre a espessamento da derme papilar e retificação da epiderme, com a diminuição da cadeia α_1 , na região dermo-epidérmica nesses pacientes. Recentemente, Bonod-Bidaud e col em 2012¹¹³, demonstram a presença da isoforma molecular $\alpha_1(V)_3$ homotrímera na pele. Estes autores sugerem que apesar desta isoforma estar em pequenas proporções na pele saudável, contribui para estabilização da interface dermo-epidérmica. Ainda, observaram que a super expressão da isoforma $\alpha_1(V)$ em camundongos transgênicos, provocava um aumento da densidade das fibrilas e alterações biomecânicas na pele, sugerindo que esta isoforma molecular serviria como ponte na junção dermo-epidérmica, juntamente com o colágeno IV e a laminina-111 da membrana basal.¹¹³

Nesse estudo, foi demonstrado uma grande diminuição da isoforma $\alpha_1(V)_3$ homotrímera, que coincide com a região de espessamento observado na derme papilar dos pacientes. Estes dados sugerem que esta alteração poderia ser resultante da desregulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas, pois a diminuição da cadeia $\alpha_1(V)$,

diminuiria os domínios globulares, responsáveis pela regulação do diâmetro das fibrilas.¹⁰⁷

Nossos resultados ultraestruturais confirmam esta hipótese, pois na pele dos pacientes com esclerodermia, observamos retificação da epiderme e fusão da lâmina basal com a derme papilar e reticular, que coincide com a proeminência das fibras de colágeno e espessamento da derme reticular. Ainda, a imunoexpressão da cadeia $\alpha 1(V)$ estava diminuída na derme papilar e aumentada na derme reticular destes pacientes, corroborando com nossos achados morfológicos, da imunofluorescência e ultraestruturais.

Por outro lado, nossos resultados quantitativos mostraram que a cadeia $\alpha 1(V)$ apresentou uma diminuição significativa na derme papilar, corroborando com os nossos dados proteicos, isolados de cultura de fibroblastos dérmicos, que indicaram diminuição da cadeia $\alpha 1(V)$ por *immunoblot*. Em contraste, nossos resultados da expressão do gene para cadeia $\alpha 1(V)$ estavam aumentados nos pacientes com ES em relação as peles saudáveis, demonstrando que esta forma molecular poderia se depositar em regiões mais profundas da pele ou ainda não serem transcritas em proteína.

Estes dados confirmam os achados de RNA mensageiro para a cadeia $\alpha 1(V)$ de Martin e col, 2012¹³⁴, que demonstraram aumento do gene para esta cadeia, em pacientes com ES. Liu T e Zhang J, 2008⁷⁰, também demonstraram que a $\alpha 1(V)$ está expressa antes do aumento do colágeno dos tipos I e III na ES. Adicionalmente, identificamos que o gene para integrina ITGA2, também teve sua expressão aumentada, sugerindo um aumento da síntese de moléculas de adesão celular com epítomos ligantes preferencialmente para o colágeno do tipo V. A expressão do gene para de TGF β 1 não foi significativa nestes pacientes, dados que confirmam os achados de Martin e col em 2012¹³⁴.

Os resultados da cadeia $\alpha 2(V)$ foram bem diferentes na pele dos pacientes com ES, quando comparada com o grupo de controles saudáveis. Na derme papilar das peles controle a expressão desta cadeia foi quase ausente e tênue na derme reticular, capilares e vasos, mostrando um padrão linear fino nestas estruturas. Por outro lado, a $\alpha 2(V)$ heterotrímica apresentou um aumento na derme reticular da pele dos pacientes com ES, apresentando-se de forma mais intensa na parede de capilares e vasos.

Adicionalmente, nossos resultados quantitativos mostraram que a cadeia $\alpha 2(V)$ apresentou um aumento significativo na derme papilar, corroborando com os nossos

dados proteicos, isolados de cultura de fibroblastos dérmicos, que indicaram aumento da cadeia $\alpha 2(V)$ por *immunoblot*. Ainda, os resultados da expressão do gene para cadeia $\alpha 2(V)$ também estavam aumentados nos pacientes com ES em relação as peles saudáveis, sugerindo um aumento de formações heterotrímeras na derme reticular e principalmente ao redor dos capilares e vasos.

Estes resultados foram confirmados pela imunoexpressão da cadeia $\alpha 2(V)$ na região espessada pela junção entre a lâmina basal e a derme reticular, sugerindo que o remodelamento da pele em pacientes com ES pode ser diferente. O aumento da cadeia $\alpha 2(V)$ na pele pode promover alterações biomecânicas, tornando o tecido mais rígido e ainda poderia promover aumento da expressão de moléculas de adesão. A cadeia $\alpha 2(V)$ é rica em sequências RGD, e é através desta sequência, preferencialmente, que o colágeno se liga às moléculas de adesão, como as integrinas.

Estudos realizados em camundongos mutantes, com ausência da expressão do gene COL5A2, mostram que os animais apresentaram um predomínio da forma homotrímera $\alpha 1(V)_3$ e dificuldade na secreção das cadeias heteotrímeras.⁹³ Nossos resultados após a inibição temporária do gene COL5A2, em fibroblastos dérmicos de pacientes com ES corroboram com os achados de Chanut-Delalande H, 2004¹⁵⁰, observou-se que o gene COL5A1 apesar de não apresentar um resultado significativo em sua expressão gênica, apresentou uma tendência de aumento para a cadeia $\alpha 1(V)$. Ainda a imunomarcagem dos fibroblastos dérmicos dos pacientes com ES, mostraram a produção de fibras mais finas sugerindo uma expressão similar aos fibroblastos do grupo controle.

Outro dado de grande relevância em nosso estudo, foi a super expressão do gene para integrina ITGA2 após a inibição temporária do gene COL5A2, era esperado uma diminuição da expressão do RNA mensageiro para integrina ITGA2, devido sua afinidade com as sequências RGD do colágeno V, porém este resultado poderia ser explicado pelo número de domínios globulares, presentes na cadeia $\alpha 1(V)_3$ que, provavelmente, facilitaria a ligação das proteínas de adesão celular.

Todos estes dados da literatura, aliados aos observados previamente pelo nosso grupo e no presente estudo indicam que o remodelamento do colágeno é um processo dinâmico e sistêmico na ES, e que a fibrilogênese na ES não depende somente dos moduladores da síntese proteica, mas também da sinalização entre célula-matriz e da interação entre suas macromoléculas.

6. CONCLUSÃO

A alteração dérmica observada em pacientes com ES está correlacionada com a modificação na distribuição das cadeias alfas do COLV, principalmente por perda acentuada da $\alpha 1(V)$ homotrímera na derme papilar e superexpressão da $[\alpha 2(V)]$ na derme reticular, em capilares e vasos, interferindo na formação de matriz extracelular normal, sugerindo uma alteração pós traducional desta proteína, e que maiores estudos sobre a inibição da cadeia $[\alpha 2(V)]$ são importantes para uma futura terapia gênica para atenuar dos sintomas desencadeados nesta patologia.

7. ANEXO

7.1 APROVAÇÃO CAPPESQ Nº 0331/10.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/10/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0331/10**, intitulado: **"ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E IMPLICAÇÃO DO RNA DE INTERFERÊNCIA NA FIBRILOGÊNESE DO COLÁGENO V EM PACIENTES COM ESCLERODERMIA "** apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Walcy Rosolia Teodoro**

Pesquisador (a) Executante: **Jymenez de Moraes**

CAPPesq, 14 de Outubro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

7.2 APROVAÇÃO CAPPESQ Nº 0817/17.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/10/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0817/07**, intitulado: **"ESTUDO COMPARATIVO DA INTERAÇÃO ENDOTÉLIO - MATRIZ EXTRACELULAR NO REMODELAMENTO DE PELE, OBSERVADA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLERODERMIA E NA ENFERMIDADE ESPONTÂNEA HUMANA."** apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. NATALINO HAJIME YOSHINARI**

Pesquisador (a) Executante: **PATRÍCIA MARTIN**

CAPPesq, 05 de Outubro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6462 e-mail: cappesq@hcfmusp.br / secretariacappesq2@hcfmusp.br-eol

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Seibold J. Connective tissue disease characterized by fibrosis. In: Ruddy S, Harris ED Jr, Sledge CD. Textbook of Rheumatology, Vol. 2. Philadelphia: WB Saunders Co; 2001; 1133-59.
2. Gilliam AC. Scleroderma. Curr Dir Autoimmun 2008; 10:258-79.
3. Giordano M, Valentini G, Migliaresi S, *et al.* Different antibody patterns and different prognoses in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. J Rheumatol 1986; 13:911-16.
4. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988; 15: 202-5.
5. Nishimagi E, Kawaguchi Y, Tanaka E, *et al.* Classification of systemic sclerosis in the Japanese population based on rapid progression of skin thickening. Mod Rheumatol 2004; 4:216–21.
6. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA, *et al.* Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum 1980; 23:581-90.
7. Barnett AJ. Classification of systemic sclerosis (scleroderma). In: Black CM, Myers AR. Current topics in rheumatology: systemic sclerosis (scleroderma). New York, NY: Gower Medical Publishing 1985:18.
8. Korn JH. Scleroderma: a treatable disease. Cleve Clin J Med 2003; 70:954-6.

9. Cottrell TR, Wise RA, Wigley FM, Boin F. The degree of skin involvement identifies distinct lung disease outcomes and survival in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(6):1060-6.
10. LeRoy EC. Systemic sclerosis: a vascular perspective. *Rheum Dis Clin N Am* 1996; 22:675-94.
11. Matucci-Cerinic M, Allanore Y, Czirjak L, *et al.* The challenge of early systemic sclerosis for the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) community. It is time to cut the Gordian knot and develop prevention or rescue strategy. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(9):1377-80.
12. Wigley FM. Vascular disease in scleroderma. *C Rev Allerg Immuol* 2009; 36:150-75.
13. Czirják L, Kumánovics G, Varjú C, *et al.* Survival and causes of death in 366 Hungarian patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:59-63.
14. Joven BE, Almodovar R, Carmona L, Carreira PE. Survival, causes of death, and risk factors associated with mortality in Spanish systemic sclerosis patients: results from a single university hospital. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 39:285- 93.
15. Al-Dhaher FF, Pope JE, Ouimet JM. Determinants of morbidity and mortality of systemic sclerosis in Canada. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 39:269-77.
16. Seibold JR, Korns JH, Clements PJ, *et al.* Recombinant human relaxin in the treatment of scleroderma: a randomized double blind, placebo controled trial. *Ann Intern Med* 2000; 132:871-9.
17. Clements PJ, Hurwitz EL, Wong WK. Skin thickness score as a predictor and correlate of outcome in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheum* 2000; 43: 2445- 52.

18. Allanore Y, Wipff J, Kahan A, Boileau C. Genetic basis for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2007; 74:577–83.
19. Kuwana M, Inoko H, Kameda H, *et al.* Association of human leukocyte antigen class II genes with autoantibody profiles, but not with disease susceptibility in Japanese patients with systemic sclerosis. *Intern Med* 1999; 38:336-44.
20. Gilchrist FC, Bunn C, Foley PJ, *et al.* Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun* 2001; 2(2):76-81.
21. Arnett FC, Gourh P, Shete S, *et al.* Major Histocompatibility Complex (MHC) class II alleles, haplotypes, and epitopes which confer susceptibility or protection in the fibrosing autoimmune disease systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:822–7.
22. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Current Opinion in Rheumatology* 2000; 12:520–6.
23. Ferri C, Zakrzewska K, Longombardo G, *et al.* Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:718-20.
24. Zakrzewska K, Corcioli F, Carlsen KM, *et al.* Human parvovirus B19 (B19V) infection in systemic sclerosis patients. *Intervirology* 2009; 52:279-82.
25. Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegl G. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol* 1997; 53:229-32.
26. Magro CM, Nuovo G, Ferri C, Crowson AN, Giuggioli D, Sebastiani M. Parvoviral infection of endothelial cells and stromal fibroblasts: a possible pathogenetic role in scleroderma. *J Cutan Pathol* 2004; 31:43–50.

27. Pandey P, LeRoy EC. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:10-5.
28. Shahgasempour S, Woodroffe SB, Sullivan-Tailyour G, Garnett HM. Alteration in the expression of endothelial cell integrin receptors alpha 5 beta 1 and alpha beta 1 and alpha 6 beta 1 after in vitro infection with a clinical isolate of human cytomegalovirus. *Arch Virol* 1997; 142:125-38.
29. Sticherling M. Systemic sclerosis - dermatological aspects. Part 1: Pathogenesis, epidemiology, clinical findings. *J Compilation JDDG* 2012; 1610:0379/405.
30. Geyer M, Müller-Ladner U. The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. *Clin Rev Allerg Immunol* 2011; 40:92-103.
31. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 509–37.
32. Derk CT, Jimenez SA. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun Rev* 2003; 2:181-191.
33. Viswanath V, Phiske MM, Gopalani VV. Systemic sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations. *Indian J Dermatol* 2013; 58(4):255-68.
34. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001; 28(7):1573-6.
35. Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, *et al*. Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Hum Pathol* 2007; 38:893-902.

36. Toya SP, Tzelepis GE. The many faces of scleroderma sine scleroderma: a literature review focusing on cardiopulmonary complications. *Rheumatol Int* 2009; 29: 861-8.
37. Weinstein WM, Kadell BM: The gastrointestinal tract in systemic sclerosis. Em Clements PJ, Furst DE (Editors): *Systemic sclerosis*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2004; 293-308.
38. Brown GE, O'Leary PA. Skin capillaries in scleroderma. *Arch Intern Med* 1925; 36:73-88.
39. Rajkumar VS, Sundberg C, Abraham DJ, Rubin K, Black CM. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(5):930-41.
40. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite AE. Vascular involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *J Inflamm Res* 2011; 4:105-25.
41. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med* 1969; 46(3):428-40.
42. Kahaleh B. Vascular disease in scleroderma: mechanisms of vascular injury. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34(1):57-71;vi.
43. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992; 166:255-63.
44. Derk CT, Jimenez SA. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun Rev* 2003; 2:181-191.

45. Trotta F, Biagini G, Cenacchi G, *et al.* Microvascular changes in progressive systemic sclerosis: immunohistochemical and ultrastructural study. Clin Exp Rheumatol 1984; 2:209-15.
46. Freemont AJ, Hoyland J, Fielding P, Hodson N, Jayson MI. Studies of the microvascular endothelium in uninvolved skin of patients with systemic sclerosis: direct evidence for a generalized microangiopathy. Br J Dermatol 1992; 126:561-68.
47. Mihai C, Tervaert JW. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2010; 69:319-24.
48. Mattuci-Cerinic M, Valentini G, Sorano GG, *et al.* Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. Semin Arthritis Rheum 2003; 32(5):285–295
49. Cipriani P, Guiducci S, Miniati I, *et al.* Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2007; 56(6):1994-04.
50. Postlethwaite AE, Chiang TM. Platelet contributions to the pathogenesis of systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol 2007; 19(6):574-79.
51. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med 2009; 360(19):1989-2003.
52. Blann AD, Illingworth K, Jayson MI. Mechanisms of endothelial cell damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. J Rheumatol 1993; 20(8):1325-30.
53. Schachna L, Wigley FM. Targeting mediators of vascular injury in scleroderma. Curr Opin Rheumatol 2002; 14(6):686-93.

54. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mol Med* 2010; 14:1241-5.
55. Hummers LK, Hall A, Wigley FM, Simons M. Abnormalities in the regulators of angiogenesis in patients with scleroderma. *J Rheumatol* 2009; 36(3):576-82.
56. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38(2):132-60.
57. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis in antigen driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004; 50:1721-33.
58. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 2002; 168:3649-59.
59. O'Reilly S1, Hügler T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(9):1540-9.
60. Deleuran B, Abraham DJ. Possible implication of the effectors CD4⁺ T-cell subpopulation TH17 in the pathogenesis of systemic scleroderma. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3:682-683.
61. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(5):R166.
62. Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, *et al.* Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clin Immunol* 2011; 139(3):249-257.

63. Khoury SJ. Th17 and Treg balance in systemic sclerosis. *Clin Immunol* 2011; 139:231-232.
64. Radstake TR, Gorlova O, Rueda B, Martin JE, et al. Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet* 2010; 42:426-29.
65. Jun, BJ, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. *Cur Opin Rheumato* 2003; 756-60.
66. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996; 107(3):404-11.
67. Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, *et al.* Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3):417-25.
68. Xu S, Denton CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM. Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S360-3.
69. Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010; 37(1):11-25.
70. Liu T, Zhang J. Expression and distribution of type I, III and V collagens in skin lesions from patients with systemic sclerosis. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2008; 39(5):748-52.
71. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J. Pathogenesis of scleroderma: Collagen. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22(4):647-74.

72. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 1974; 54(4):880-89.
73. Eckes B, Mauch C, Huppe G, Krieg T. Differential regulation of transcription and transcript stability of pro-alpha 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochem J* 1996; 315(Pt 2):549-54.
74. Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 2003; 90(6):993- 02.
75. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 2014; 27;5:123.
76. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, *et al.* Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2004; 15:2707-19.
77. Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest.* 1987;79(4):1285–1288
78. Pannu J, Gardner H, Shearstone JR, Smith E, Trojanowska M. Increased levels of transforming growth factor beta receptor type I and up-regulation of matrix gene program: A model of scleroderma. *Arthritis Rheum* 2006; 54(9):3011-21.
79. Varga J, Whitfield ML. Transforming growth factor-beta in systemic sclerosis (scleroderma). *Front Biosci (Schol Ed)* 2009; 1(1):226-35.
80. Peng WJ1, Yan JW, Wan YN, *et al.* Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. *J Clin Immunol* 2012; 32(6):1409-14.

81. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: A mediator of TGF- β action of fibroblast. *Cytokine Growth Factor* 1997; 8:171-179.
82. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992; 35(1):67-72.
83. Leask A, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4(2):136–142.
84. Blaauboer ME, Boeijen FR, Emson CL, *et al.* Extracellular matrix proteins: a positive feedback loop in lung fibrosis? *Matrix Biol* 2014; 34:170-8.
85. Gilbane AJ, Denton CP, Holmes AM. Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(3):215.
86. O'Reilly S. Role of interleukin-13 in fibrosis, particularly systemic sclerosis. *Biofactors* 2013;39(6):593-6.
87. Fuschiotti P1, Larregina AT, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger TA Jr. Interleukin-13 producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2013; 65(1):236-46.
88. Eap R, Jacques E, Semlali A, Plante S, Chakir J. Cysteinyl leukotrienes regulate TGF- β 1 and collagen production by bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2012; 86(3):127-33.
89. Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, *et al.* Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(1):73-82.

90. Chen CC, Chen LL, Hsu YT, Liu KJ, Fan CS, Huang TS. The endothelin-integrin axis is involved in macrophage-induced breast cancer cell chemotactic interactions with endothelial cells. *J Biol Chem* 2014; 4;289(14):10029-4.
91. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Increased expression of integrin $\alpha(v)\beta3$ contributes to the establishment of autocrine TGF- β signaling in scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 2005; 175(11):7708-18.
92. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens: structure, function and biosynthesis. *Advanc Drug Delivery Reviews* 2003; 55:1531-46.
93. Linsenmayer, T.F. *Cell Biology of Extracellular Matrix* 2 edition. New York: Plenum Press 1991; 7-43.
94. Prockop, DP, Kivirikko, KL, Tuderman, L, Guzman, NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N. England J. Med* 1979;301:12-23.
95. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(1):a004978.
96. Ricard-Blum S, Dublet B, Rest MDV. Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI and XIX. *Protein Profile Series*. Oxford University Press, Oxford, UK 2000.
97. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 247-257.
98. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al.* *Molecular Biology of the Cell*, 3th edition. New York: Garland Science; 1994.
99. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 929-958.

100. Alberts, B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 5^a ed. São Paulo: Artmed; 2010. cap19.1131-1204. Junções Extracelulares, Adesão Celular e Matriz Extracelular.
101. Bachinger HP; Mizuno K; Vranka JA; Boudko SP. *Collagen Formation and Structure*. Oregon Health & Science University, Portland 2010.
- 102.. Smith LT. Holbrook KA. Madri JA. Collagen Types I, III, and V in Human Embryonic and Fetal Skin *American J Anatomy* 1986;175:507-521.
103. Bruckner P. Suprastructures of extracellular matrices: Paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 7–18.
104. Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter Bases da Histologia*. 2 edição. Rio Janeiro: Capitulo 3, Tecido Conjuntivo, 2014;51-70.
105. Marcos-Garcés V, Molina Aguilar P, Bea Serrano C, *et al.* Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study. *J Anat* 2014; 225(1):98-108.
106. Linsenmayer TF1, Gibney E, Igoe F, *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.
107. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Science* 1990; 95:649-657.
108. Meige W N; Gay S; Weber L. Dermal Architecture and Collagen Type Distribution. *Arch. Derm Res* 1977; 259, 1-10

109. Gruschwitz M, von den Driesch P, Kellner I, Hornstein OP, Sterry W. Expression of adhesion proteins involved in cell-cell and cell-matrix interactions in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27:169-77.
110. 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): 417-426.
111. Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens. Controlling elements in corneal morphogenesis? *Ann N Y Acad Sci* 1990;580:143-60.
112. Chung E, Rhodes K, Miller EJ. Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 23;71(4):1167-74.
113. Bonod-Bidaud C, Roulet M, Hansen U. In Vivo Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis-Dermis Interface. *J Invest Dermat* 2012; 132: 1841-184.
114. Imamura Y1, Scott IC, Greenspan DS. The pro-alpha3(V) collagen chain. Complete primary structure, expression domains in adult and developing tissues, and comparison to the structures and expression domains of the other types V and XI procollagen chains. *J Biol Chem* 2000; 24;275(12):8749-59.
115. Gopalakrishnan B, Wang WM, Greenspan DS. Biosynthetic processing of the Pro-alpha1(V)Pro-alpha2(V)Pro-alpha3(V) procollagen heterotrimer. *J Biol Chem*. 2004 16;279(29):30904-12.
116. Smith SM1, Birk DE. Focus on molecules: collagens V and XI. *Exp Eye Res*. 2012; 98:105-6.

117. Birk DE. Type V collagen: heterotopic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 2001, 32(3):223-37
118. Linsenmayer TF, Gigney E, Igoe E, *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; 121:1181-9.
119. Ruggiero F, Champlaud MF, Garrone R, Aumailley M. Interactions between cells and collagen V molecules or single chains involve distinct mechanisms. *Experimental cell Research* 1994; 210(2):215-23.
120. Ruggiero F, Comte J, Cabañas C, Garrone R. Structural requirements for alpha1b1 and alpha2b1 integrin mediated cell adhesion to collagen V. *J Cell Sci* 1996;109 (7):1865-74.
121. Levin AL, Siv FEN, Hoeve JV, *et al.* Adler's Physiology of the Eye. Chapter 4: Cornea and Sclera. *Sunders*, 11 ed, 2011.
122. Yaoi Y, Hashimoto K, Koitabashi H, Takahara K, Ito M, Kato I.(1990) Primary structure of the heparin-binding site of type V collagen. *Biochim Biophys Acta*. 1035(2):139-45.
123. Delacoux F, Fichard A, Geourjon C, Garrone R, Ruggiero F. (1998) Molecular Features of the Collagen V Heparin Binding Site. *J Biol Chem*. 273(24):15069-76.
124. Ricard-Blum S, Beraud M, Raynal N, Farndale RW, Ruggiero F. (2006) Structural Requirements for Heparin/Heparan Sulfate Binding to Type V Collagen. *J Biol Chem*. 281(35):25195-204
125. Luparello C, Sirchia R. Type V collagen regulates the expression of apoptotic and stress response genes by breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2005; 202(2):411-21

126. Bonifazi M, Tramacere I, Pomponio G, *et al.* Systemic sclerosis (scleroderma) and cancer risk: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Rheumatology (Oxford)* 2013 ;52(1):143-54.
127. Segev F, Héon E, Cole WG, *et al.* Structural abnormalities of the cornea and lid resulting from collagen V mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(2):565-73.
128. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers–Danlos syndrome (types I and II). *Am J Hum Genet* 2000;66(6):1757–65.
129. Wenstrup RJ, Florer JB, Willing MC, *et al.* COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS. *Am J Hum Genet.* 2000;66(6):1766-76.
130. Hoffman GG, Dodson GE, Cole WG, Greenspan DS. Absence of apparent disease causing mutations in COL5A3 in 13 patients with hypermobility Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Med Genet A* 2008; 15;146A(24):3240-1.
131. Loeys BL, Gerber EE, Riegert-Johnson D, *et al.* Mutations in fibrillin-1 cause congenital scleroderma: stiff skin syndrome. *Sci Transl Med* 2010;2(23):23ra20.
132. Milano A, Pendergrass SA, Sargent JL, *et al.* Molecular subsets in the gene expression signatures of scleroderma skin. *PLoS One* 2008;3(7):e2696.
133. Parra ER, Teodoro WR, de Moraes J, *et al.* Increased mRNA expression of collagen V gene in pulmonary fibrosis of systemic sclerosis. *Eur J Clin Invest* 2010; 40(2):110-20.
134. Martin P, Teodoro WR, Velosa AP, *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.

135. Velosa AP, Teodoro WR, de Oliveira CC, *et al.* Collagen V nasal tolerance in experimental model of systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 2007; 299(4):177-189.
136. Callado MR, Viana VS, Vendramini MB, Leon EP, Bueno C, Velosa AP, Teodoro WR, Yoshinari NH. Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology* 2007; 122:38-46.
137. Andrikopoulos K, 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.
138. Phelps RG, Murai C, Saito S, Hatakeyama A, Andrikopoulos K, Kasturi KN, Bona CA. Effect of targeted mutation in collagen V alpha 2 gene on development of cutaneous hyperplasia in tight skin mice. *Mol Med* 1998; 4(5):356-60.
139. Wang Q, Peng Z, Xiao S, Geng S, Yuan J, Li Z. RNAi-mediated inhibition of COL1A1 and COL3A1 in human skin fibroblasts. *Exp Dermatol* 2007; 16(7):611-7.
140. Xiao R, Liu FY, Luo JY, *et al.* Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2006; 155(6):1145-53.
141. van den Hoogen F, Khann D, Fransen J, *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65(11):2737-47.
142. White B, Bauer EA, Goldsmith LA, *et al.* Guidelines for clinical trials in systemic sclerosis (scleroderma). I. Disease-Modification Intervention. *Arthritis Rheum* 1995; 28:351-60.
143. Clements PJ, Lachenbruch P, Siebold. Inter and Intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1995; 22:1281-5.

144. Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, *et al.* European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:592-8.
145. Valentini G, Silman AJ, Veale D. Assessment of disease activity. *Clin. Exp. Rheum* 2003; 21:S39-S41.
146. Cotton SA, Herrick AL, Jaysson MIV, Freemont A. Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosin in systemic sclerosis skin. *J Pathol* 1999; 189:273-8.
147. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, *et al.* Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen mmunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract* 2004; 200(10):681-91.
148. Chomezynski P, Sacchi N. Single step methodo of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanati-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-150.
149. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin Invstig* 2007; 117:557-67
150. Chanut-Delalande H, Bonod-Bidaud C, Cogne S, *et al.* Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. *Mol Cell Biol* 2004;24(13):6049-57.