ROBERTA GONÇALVES MARANGONI

**Estudo da vasculopatia pulmonar no modelo
experimental de esclerodermia induzido pelo
colágeno do tipo V**

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

Orientador: Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari

**SÃO PAULO
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marangoni, Roberta Gonçalves

Estudo da vasculopatia pulmonar no modelo experimental de esclerodermia induzido pelo colágeno do tipo V / Roberta Gonçalves Marangoni. -- São Paulo, 2011.

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

Orientador: Natalino Hajime Yoshinari.

Descritores: 1.Escleroderma sistêmico 2.Modelos animais 3.Colágeno tipo V 4.Pulmão 5.Endotélio vascular

USP/FM/DBD-277/11

Dedico esta tese ao meu avô, Dr. Joaquim Gonçalves Filho, precursor da Reumatologia da família Gonçalves, que transmitiu o amor à Medicina em especial a esta especialidade para todos nós.

*Ao meu pai, Célio Roberto Gonçalves e minha mãe,
Mara Elizabeth Moya Gonçalves, tão queridos, que
sempre estiveram ao meu lado, estimulando,
orientando e passando segurança.*

*Ao meu amado marido, Felipe Ferreira Marangoni,
pelo SEMPRE apoio, compreensão, estímulo e
amor.*

*As minhas irmãs, Carla e Renata, pelo apoio,
carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu sempre professor e orientador, Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari, pelos ensinamentos desde o início da minha carreira a ter o pensamento e postura correta de um pesquisador.

À Prof^a. Dr^a. Eloisa Bonfá, pelo apoio, oportunidades e importantes orientações.

À Prof^a. Dr^a. Vera Luiza Capelozzi, pelos ricos ensinamentos da patologia pulmonar e da pesquisa científica.

Ao Dr. Edwin Parra, meu par nessa pesquisa, pela ajuda, paciência e valiosas discussões.

À Walcy Rosolia Teodoro, por sempre estar ao meu lado e quem me ensinou a importância da matriz extracelular e tudo sobre o colágeno V.

À Paula Pereira Velosa, por sempre estar presente e disposta a ajudar, uma pessoa que admiro muito.

Ao Hermes Barbeiro, pela grande contribuição na realização desta pesquisa.

A Solange Carrasco, pela amizade e pelos ensinamentos da cultura celular.

À Jymenez de Moraes, pela amizade e parceria nesta pesquisa.

Ao Antonio dos Santos Filho, e os outros profissionais do Biotério, Valdeci e Valter, pela ajuda nos procedimentos com os animais e seriedade no cuidado com os mesmos.

À Angela Batista dos Santos e Maria Cristina Medeiros, pela amizade e parceria nas reações imuno-histoquímicas, que foram muitas.

Aos funcionários da Patologia, especialmente à Ana Paula M. Silva, pelo apoio durante esta pesquisa, atendendo sempre prontamente aos meus pedidos.

Às amigas do Laboratório de Interação Microorganismo e Artrite, Elenice, Virginia e Luiza, pelo apoio, amizade, carinho e força.

À todas as colegas do Laboratório de Matriz Extracelular, pelo apoio e amizade.

À Vilma, Cleonice, Margareth e Elaine, pelo apoio e ajuda quando necessários.

Às secretárias da Reumatologia, Cláudia, Marta e Iná, por estarem sempre prontas a me ajudar.

Aos meus grandes amigos, Lena, Beatriz, Fernanda, Maurício, Thaís, Rodrigo e Daniel, e todos os outros que direta ou indiretamente participaram deste processo comigo.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de quadros	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Summary	

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações Gerais	2
1.2 Patogênese.....	4
1.3 Vasculopatia	8
1.4 Complicações Pulmonares	10
1.5 Modelos Experimentais.....	12
1.6 Modelo Induzido Por Meio da Imunização com COLV.....	17
1.7 Colágeno do Tipo V	18
1.8 Justificativa do Estudo	21
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 MÉTODOS	25
3.1 Animais	26
3.2 Modelo Experimental de ES por Imunização com COLV.....	27
3.3 Obtenção dos Pulmões.....	28
3.4 Análise dos Vasos Pulmonares	29
3.5 Imuno-histoquímica.....	30
3.6 Quantificação do colágeno por meio da dosagem da 4- hidroxiprolina	31
3.6.1 Hidrólise ácida.....	32
3.6.2 Neutralização	32
3.6.3 Oxidação	32
3.6.4 Coloração	33
3.6.5 Leitura e resultados.....	33
3.7 Avaliação Morfométrica	34
3.8 Microscopia Eletrônica.....	35
3.9 Reatividade Vascular em Artéria Pulmonar, Por Curva Dose- Resposta de Acetilcolina e Noradrenalina.....	36

3.10 Biologia Molecular.....	38
3.10.1 Pulverização do Material e Extração do RNA total.....	38
3.10.2 Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria.....	39
3.10.3 Avaliação da integridade do RNA por meio de eletroforese em gel de agarose.....	39
3.10.4 Reação de transcriptase reversa (RT) para obtenção de cDNA.....	40
3.10.5 Seleção e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	40
3.10.6 Padronização da reação em cadeia da polimerização em tempo real quantitativa (qRT-PCR) pelo sistema SYBR Green.....	42
3.11 Análise Estatística.....	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Análise Morfológica das Artérias Pulmonares Por Meio da Coloração de Hematoxilina e Eosina.....	48
4.2 Análise da Área do Lúmen e Espessamento da Parede Vascular das Artérias Pulmonares	50
4.3 Alterações Ultraestruturais das Artérias Pulmonares.....	52
4.4 Avaliação do Grau de Lesão Arterial Mediante a Porcentagem de Células Endoteliais CD31+	57
4.5 Avaliação do Grau de Lesão Arterial Mediante a Taxa de Apoptose Caspase-3+ das Células Endoteliais.....	63
4.6 Avaliação do Grau de Lesão Arterial Mediante os Índices de Atividade Endotelial VEGF+ e ET-1+	68
4.7 Teste de Vasoreatividade em Artéria Pulmonar	78
4.8 Dosagem Bioquímica do Colágeno no Tecido Pulmonar.....	80
4.9 Avaliação da expressão do RNAm dos colágenos I, III e V pela PCR em tempo real	81
5 DISCUSSÃO.....	84
6 CONCLUSÕES.....	95
7 ANEXOS.....	97
8 REFERÊNCIAS	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFI	- Adjuvante incompleto de Freund
BSA	- Albumina de soro bovino
CAPPesq	- Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
COLI	- Colágeno tipo I
COLV	- Colágeno do tipo V
CT	- Controles
Ct	- Fluorescência
CTGF	- Fator de crescimento do tecido conjuntivo
DAB	- Diaminobenzidina
DTT	- Ditioneitol
Egr-1	- Resposta de crescimento precoce 1
ES	- Esclerose sistêmica
ET-1	- Endotelina do tipo I
Fli-1	- Fator de integração 1
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FP	- Fibrose pulmonar
Fra-2	- Antígeno Fos
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GVHD	- Doença do enxerto contra o hospedeiro
HAP	- Hipertensão arterial pulmonar
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	- Antígeno leucócito humano
HOCl	- Ácido hipocloroso
IL	- Interleucina
IM	- Via intramuscular
MEC	- Constituintes da matriz extracelular
NZW	- Nova Zelândia brancos
OH	- Radicais hidroxil
ONOO-	- Ânions peroxinitritos

P	- Porcentagem
PBS	- Tampão fosfato salino
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerização
PDGF	- Fator de crescimento derivado das plaquetas
qRT-PCR	- Padronização da reação em cadeia da polimerização
RT	- Transcriptase Reversa
SBCAL/COBEA	- Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SC	- Via subcutânea
SNPs	- Polimorfismos específicos de um único nucleotídeo
TGF β	- Fator de crescimento de transformação-beta
TKS1/+	- <i>Tight skin tipo 1</i>
TSK-2/+	- <i>Tight skin tipo 2</i>
T β RI	- Receptores transmembrânicos conhecidos como tipo I
T β RII	- Receptores transmembrânicos conhecidos como tipo II
VEGF	- Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo de imunização dos coelhos com COLV	27
Figura 2 -	Imagem do retículo que é acoplado a uma das oculares do microscópio.....	35
Figura 3 -	Banho de órgão isolado conectado a um transdutor de tensão	37
Figura 4 -	Representação do teste de eficiência: primers	43
Figura 5 -	Microscopia óptica das pequenas artérias pulmonares dos coelhos IM-COLV (B, D e F) e CT (A, C e E) dos Grupos 7, 75 e 210 (coloração HE, aumento200x).....	49
Figura 6 -	Microscopia eletrônica das pequenas artérias pulmonares dos coelhos IM-COLV e CT do Grupo.....	54
Figura 7 -	Microscopia eletrônica das pequenas artérias pulmonares dos coelhos CT e IM-COLV do Grupo 75.....	55
Figura 8 -	Microscopia eletrônica das pequenas artérias pulmonares dos coelhos CT e IM-COLV do Grupo 210.....	56
Figura 9 -	Imagens representativas de tecido pulmonar de coelhos CT e de IM-COLV dos Grupos 7, 75 e 210 com imunomarcção em células endoteliais de CD31, caspase-3, VEGF e ET-1. As setas indicam as células imunomarcadas. Aumento original 200X	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica	30
Quadro 2 - Sequência e descrição dos genes selecionados para o estudo	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise morfométrica das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV do Grupo 210*	51
Tabela 2 -	Distribuição do grau de lesão arterial de acordo com a porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias pulmonares dos animais IM-COLV e CT no Grupo 7*	59
Tabela 3 -	Distribuição do grau de lesão arterial de acordo com a porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias pulmonares dos animais IM-COLV e CT no Grupo 75*	60
Tabela 4 -	Distribuição do grau de lesão arterial de acordo com a porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias pulmonares dos animais IM-COLV e CT no Grupo 210*	61
Tabela 5 -	Distribuição do grau de lesão arterial através da porcentagem de células endoteliais CD31+ presentes ao longo do tempo nos animais CT e IM-COLV*	62
Tabela 6 -	Distribuição do grau de lesão arterial mediante a taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais dos animais IM-COLV e CT no Grupo 7*	64
Tabela 7 -	Distribuição do grau de lesão arterial mediante a taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais dos animais IM-COLV e CT no Grupo 75*	65
Tabela 8 -	Distribuição do grau de lesão arterial mediante a taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais dos animais IM-COLV e CT no Grupo 210*	66
Tabela 9 -	Distribuição do grau de lesão arterial através da taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais presentes ao longo do tempo nos animais CT e IM-COLV*	67
Tabela 10 -	Distribuição do grau de lesão arterial mediante os índices de expressão do VEGF+ pelas células endoteliais dos animais IM-COLV e CT, nos Grupos 7, 75 e 210*	69
Tabela 11 -	Distribuição do grau de lesão arterial mediante os índices de expressão da ET-1+ pelas células endoteliais dos animais IM-COLV e CT nos Grupos 7, 75 e 210*	73

Tabela 12 - Distribuição do grau de lesão arterial através do índice de atividade VEGF+ das células endoteliais presentes ao longo do tempo nos animais CT e IM-COLV*	76
Tabela 13 - Distribuição do grau de lesão arterial através do índice de atividade ET-1+ das células endoteliais presentes ao longo do tempo nos animais CT e IM-COLV*	77
Tabela 14 - Dosagem de 4-hidroxiprolina no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV e dos CT dos Grupos 7, 75 e 210*	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	A espessura relativa da parede das artérias pulmonares de pequeno, médio e grande calibre não difere entre os coelhos CT e os IM-COLV no Grupo 210.....	51
Gráfico 2 -	A área interna relativa das artérias pulmonares de pequeno, médio e grande calibre não difere nos coelhos CT e nos IM-COLV no Grupo 210	52
Gráfico 3 -	Porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias intrapulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV no Grupo 7	59
Gráfico 4 -	Porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias intrapulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV no Grupo 75	60
Gráfico 5 -	Porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias intrapulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV no Grupo 210	61
Gráfico 6 -	Análise temporal comparativa do grau de lesão arterial através da porcentagem de células endoteliais CD31+ nos Grupos 7, 75 e 210 dos coelhos CT e IM-COLV	62
Gráfico 7 -	Taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 7	64
Gráfico 8 -	Taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 75	65
Gráfico 9 -	Taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 210	66
Gráfico 10	Análise temporal comparativa do grau de lesão arterial através da porcentagem de apoptose caspase-3+ das células endoteliais nos Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e dos IM-COLV	67
Gráfico 11 -	Índice de atividade endotelial VEGF+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 7.....	70

Gráfico 12 -	Índice de atividade endotelial VEGF+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 75.....	71
Gráfico 13 -	Índice de atividade endotelial VEGF+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 210	72
Gráfico 14 -	Índice de atividade endotelial ET-1+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 7.....	74
Gráfico 15 -	Índice de atividade endotelial ET-1+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 75.....	75
Gráfico 16 -	Índice de atividade endotelial ET-1+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 210	76
Gráfico 17 -	Análise temporal comparativa do grau de lesão arterial através do índice de atividade endotelial VEGF+ nos Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e dos IM-COLV	77
Gráfico 18 -	Análise temporal comparativa do grau de lesão arterial através do índice de atividade endotelial ET-1+ nos Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e dos IM-COLV	78
Gráfico 19 -	Relaxamento máximo dos anéis de artéria pulmonar dos coelhos CT e dos IM-COLV do Grupo 210.....	79
Gráfico 20 -	EC50 dos anéis de artéria pulmonar dos coelhos CT e dos IM-COLV do Grupo 210	79
Gráfico 21 -	Representação gráfica da quantidade de 4-hidroxiprolina no tecido pulmonar nos coelhos IM-COLV e nos CT nos Grupos 7, 75 e 210	81
Gráfico 22 -	Expressão de RNAm do COLI no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV e dos CT dos Grupos 7, 75 e 210.....	82
Gráfico 23 -	Expressão de RNAm do COLIII no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV e dos CT dos Grupos 7, 75 e 210.....	82
Gráfico 24 -	Expressão de RNAm do COLV no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV e dos CT dos Grupos 7, 75 e 210.....	83

RESUMO

Marangoni RG. *Estudo da vasculopatia pulmonar no modelo experimental de esclerodermia induzido pelo colágeno do tipo V* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

A esclerodermia sistêmica (ES) é caracterizada por fibrose da pele e órgãos internos, ativação imunológica e vasculopatia. Os modelos animais de ES sofrem com a falta de uma prova definitiva para o envolvimento vascular observado na doença humana. Um novo modelo induzido por colágeno do tipo V (COLV) reproduz muitas características da ES como fibrose e fenômenos imunológicos. No entanto, o estudo da vasculopatia ainda não foi abordado. O objetivo desse estudo foi investigar as alterações estruturais e funcionais das células endoteliais das artérias pulmonares do modelo de ES induzido pelo COLV, assim como determinar a doença pulmonar com ênfase especial no depósito de colágeno e síntese de RNAm de colágenos. Coelhos fêmeas Nova Zelândia (n = 8) foram imunizados com COLV humano emulsificado em adjuvante de Freund ou apenas com adjuvante de Freund (controle; n = 8). Após 7, 75 e 210 dias, os animais foram sacrificados e os pulmões foram analisados por microscopia eletrônica, hematoxilina e eosina, e marcações especiais incluindo imunomarcagem para neovascularização (CD31), apoptose de células endoteliais (induzida pela caspase-3) e atividade endotelial (endotelina-1 e VEGF). A resposta vascular a acetilcolina (Ach) foi estudada em anéis de artéria pulmonar isolada. Para determinar o conteúdo de colágeno, expressão RNAm dos colágenos I, III e V e quantidade de colágeno (hidroxiprolina aminoácido específico), os pulmões foram submetidos a imunofluorescência, PCR em tempo real e análise bioquímica. Foi observado que os coelhos imunizados com COLV apresentaram um aumento progressivo de apoptose e atividade das células endoteliais a partir de 7 dias quando comparados aos coelhos controle ($p \leq 0,01$). Em contrapartida, apenas aos 210 dias os coelhos imunizados com COLV apresentaram aumento significativo na neovascularização quando comparados com o grupo controle ($p < 0,001$). Coincidente com esses achados, a microscopia eletrônica mostrou alterações das células endoteliais caracterizada por apoptose, alterações degenerativas das organelas e tumefação citoplasmática. As células endoteliais pareciam estar destacadas da membrana basal. Os coelhos imunizados com COLV de 210 dias necessitaram de uma dose maior de Ach do que os controles para alcançar o relaxamento máximo de 50% (EC_{50}) dos anéis de artéria pulmonar ($p = 0,02$). Por fim, foi observado que os coelhos de 210 dias imunizados com COLV apresentaram uma intensa expressão de COLV no interstício broncovascular, acompanhado de um aumento na expressão

do RNAm ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. Os coelhos imunizados com COLV apresentaram uma maior quantidade de conteúdo de colágeno, quando comparados com os controles, nos diferentes tempos estudados ($p < 0,01$). Este estudo fornece evidência para a disfunção pulmonar do endotélio vascular em coelhos com ES induzida pelo COLV. As alterações observadas, nesse estudo, reforçam o papel do endotélio como evento patogênico primário na ES. Desta forma, o modelo ES induzido pelo COLV pode fornecer informações importantes sobre a patogênese da doença humana.

Descritores: Escleroderma sistêmico. Modelos animais. Colágeno tipo V. Pulmão. Endotélio vascular.

SUMMARY

Marangoni RG. *Study of pulmonary vasculopathy in the collagen V-induced systemic sclerosis experimental model* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

The hallmarks of systemic sclerosis (SSc) are fibrosis of skin and internal organs, immune activity and vasculopathy. Animal models of SSc suffer from lack of a definitive evidence for vascular involvement observed in human disease. A novel model induced by collagen type V (COLV) reproduces many features of SSc, however vascular study has not been addressed. The aim of the present study was therefore evaluate pulmonary arteries for structural and functional alterations in endothelial cells in the COLV-induced SSc model, as well as determine the lung disease with special emphasis on collagen deposition and mRNA collagen synthesis. Female New Zealand rabbits (n = 8) were immunized with human COLV/Freund's adjuvant or Freund's adjuvant alone (control; n = 8). After 7, 75 and 210 days, the animals were sacrificed and the lungs were examined by electron microscopy, hematoxylin&eosin and special stains including immunostaining for neovascularization (CD31), endothelial cells apoptosis (caspase-3 induced) and endothelial activity (endothelin-1 and VEGF). Vascular response to acetylcholine (Ach) on isolated pulmonary artery rings was evaluated. To determine collagen content, mRNA expressions of COL I, III and V, and the quantity of collagen-specific amino acid hydroxyproline, the lungs were submitted to immunofluorescence, real-time qPCR and biochemical examination. The COLV rabbits demonstrated an endothelial cells apoptosis and activity compared to control rabbits starting at day-7 ($p \leq 0.01$). A significant increase in neovascularization was observed only in the COLV-rabbits at day-210 ($p < 0.001$). Coincident with these findings, the electron microscopy revealed extensive endothelial cells abnormalities characterized by apoptosis, degenerative organelle changes and cytoplasmic tumefaction. Endothelial cells appeared to be detached from the basement membrane. Ach dose required to achieve 50% maximum relaxation (EC_{50}) of pulmonary artery rings was increased in COLV rabbits at day-210 ($p = 0.02$). The content of hydroxyproline was increased in COLV rabbits compared with that observed in control rabbits, at the different days studied ($p < 0.01$). Ultimately, the COLV rabbits at 210-day showed an intense expression of COLV in the bronchovascular interstitium, followed by a markedly up-regulation of COLV mRNA ($p < 0.001$) as compared to controls. This study provides evidence for pulmonary vascular endothelial cell dysfunction in rabbits with COLV-induced SSc. The findings of this study reinforce the role

of endothelial cells as a primary pathogenic event in SSc. The COLV model may provide insight into the pathogenesis of human disease.

Descriptors: Scleroderma systemic. Models animal. Collagen type V. Lung. Vascular endothelium.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença sistêmica grave, que acomete cerca de 7 casos/milhão a 489 casos/milhão de habitantes¹. É caracterizada por fibrose de pele e órgãos internos, fenômenos autoimunes e lesão vascular². É uma condição descrita desde o tempo de Hipócrates, porém o conceito de esclerodermia como doença foi introduzido por Roberta H. Goetz, em 1945³. A ES é cerca de quatro a cinco vezes mais comum entre as mulheres do que homens, tem uma distribuição universal e não apresenta predileção por etnia. A idade média no momento do diagnóstico é de aproximadamente 40 anos, e raramente ocorre em crianças⁴.

A doença possui um largo espectro de gravidade e embora as alterações cutâneas seja a forma mais marcante do quadro clínico, a mesma comumente afeta também a circulação periférica, os pulmões, o coração, os rins, as articulações, os músculos e o trato gastrointestinal. Nas formas mais leves, o quadro clínico pode ser restrito ao fenômeno de Raynaud e espessamento cutâneo discreto. Por outro lado, indivíduos com espectro mais grave da doença podem apresentar espessamento cutâneo difuso acompanhado de envolvimento de órgãos nobres, que levam a risco de vida⁵.

Os critérios diagnósticos do Colégio Americano de Reumatologia para a esclerodermia incluem o espessamento cutâneo proximal às articulações

metacarpofalangeanas, e pelo menos dois dos seguintes critérios: esclerodactilia, microulcerações digitais, perda de substância da polpa digital e fibrose nas bases pulmonares⁶. A ES foi classificada em subtipos de acordo com o padrão de espessamento cutâneo, o que implica no prognóstico da enfermidade e no risco de acometimento de órgãos internos. Nesse sentido, pacientes com esclerose cutânea distal ao cotovelo e joelho e com envolvimento da face foram definidos como ES limitada; já aqueles com esclerose cutânea extensa, envolvendo também a pele proximal ao cotovelo e joelho, ou com envolvimento do tronco, foram definidos como ES difusa⁴. A ES apresenta uma das maiores taxas de mortalidade entre as doenças autoimunes⁷ e tem uma estreita relação com a fibrose ou doença vascular acometendo órgãos internos. O envolvimento pulmonar na forma de fibrose ou doença vascular é hoje a principal causa de mortalidade^{8,9}.

Apesar da ES estar associada a uma alta taxa de mortalidade, o seu tratamento continua sendo um grande desafio, já que até hoje nenhuma droga provou ser efetiva no combate à doença^{10,11}. Estudos randomizados placebo controlados são raros¹²⁻¹⁸, com poucas evidências de eficácia. Novas terapias direcionadas para diferentes vias biológicas têm sido estudadas e reforçam a necessidade de mais estudos na área¹¹.

1.2 Patogênese

Dentre as principais características da ES estão a fibrose da pele e de outros órgãos internos, como pulmão, coração, rim e esôfago; a ativação do sistema imunológico com produção de anticorpos específicos, como o anticentrômero e o antitopoisomerase I; e a vasculopatia com envolvimento de vasos de diferentes calibres². A relação entre essas três principais características ainda não está esclarecida.

Embora ainda não se conheça a causa da ES, acredita-se que a expressão da doença seja o resultado de uma complexa interação entre a genética do hospedeiro e o ambiente. Não existem evidências de uma herança mendeliana, mas a genética parece ter um papel importante na suscetibilidade e na progressão da doença. Nesse aspecto, estudos familiares revelaram uma frequência de 1,6% de ES entre parentes de primeiro grau¹⁹. Reforçando a importância do risco genético, a doença é aproximadamente 100 vezes mais comum entre os índios Choctaw de Oklahoma, associada a um haplótipo de antígeno leucócito humano (HLA)²⁰. Além disso, o amplo rastreamento de genoma tem identificado associações genéticas e, em particular, polimorfismos específicos de um único nucleotídeo (SNPs)²¹. Os polimorfismos genéticos encontrados nos pacientes com ES incluem diversos genes envolvidos na regulação imune, como BANK1, C8orf13- BLK, IL-23R, IRF5, STAT4, TBX21 e TNFSF4²². Porém, a associação genética mais significativa está entre os tipos de HLA e a presença de autoanticorpos definidos, o que sugere forte influência imunogenética na ES, com ativação alterada de ambos os compartimentos de células T e B, fornecendo um potente mecanismo para autoimunidade²³.

Diversos fatores foram propostos como agentes causais da doença, incluindo a exposição a solventes orgânicos e toxinas²⁴, a agentes infecciosos, como o citomegalovírus²⁵, o microquimerismo²⁶, e a propensão adquirida para stress oxidativo associado à geração de radicais livres²⁷.

Mas, um dos principais desafios do estudo da ES é compreender a transição dos eventos precoces para o desenvolvimento da fibrose. Os eventos patológicos na ES podem incluir: alteração na comunicação entre as células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos; ativação linfocitária; produção de autoanticorpos; inflamação; fibrose do tecido conjuntivo. Estes eventos resultam no acúmulo de constituintes da matriz extracelular (MEC), que substitui a arquitetura tecidual normal, o que pode culminar com a falência do órgão²⁸⁻³⁰.

A lesão vascular é considerada um dos eventos patogênicos mais precoces da ES, sendo caracterizada pela ativação da célula endotelial e pela alteração do tônus vascular. Após a ativação da célula endotelial, ocorre progressiva desorganização da arquitetura vascular, além da proliferação dessas células, do espessamento da camada íntima e de oclusão vascular. Estes processos resultam em aumento da permeabilidade vascular e atração de células inflamatórias, em liberação de fatores de crescimento, em citocinas, em quimiocinas e em produção de mediadores vasoativos^{28,31,32}.

O principal mediador vasoativo sintetizado pelas células endoteliais é a endotelina do tipo I (ET-1), isoforma mais importante dentre as três endotelinas existentes³³. A ET-1 também é produzida por células mesenquimais, como os

fibroblastos e as células da musculatura lisa. A ET-1 promove vasoconstrição e proliferação das células da camada muscular lisa, além de estimular a produção de fatores pró-fibróticos, como o fator de crescimento de transformação-beta (TGF β) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Nos fibroblastos, a ET-1 causa aumento na produção de componentes da MEC e promove a expressão das moléculas de adesão celular, facilitando a interação leucócito-fibroblasto. A ET-1 também apresenta outras funções importantes, como o efeito quimiotático para os macrófagos e a diferenciação dos fibroblastos para o fenótipo miofibroblastos^{28,34,35}.

Existem várias evidências que sugerem a importância das células T na patogênese da ES^{36,37}. Estas células foram detectadas nas fases iniciais da ES em estudos de pele de pacientes, antes do desenvolvimento da fibrose³⁸. A estimulação do sistema imunológico é representada pela presença de células mononucleares ricas em linfócitos T com fenótipo Th2, que expressam marcadores de superfície CD4+ e também CD8+ α/β polarizadas³⁹⁻⁴¹. A atividade pró-fibrogênica do sistema Th2 deve-se à produção excessiva de certas citocinas, sendo que a IL-4 é a mais representativa, pois induz a produção de colágeno pelos fibroblastos e estimula a síntese de TGF β ^{42,43}.

O TGF β tem sido considerado uma das moléculas mais importantes envolvidas na patogênese da ES, especialmente pela sua atividade pró-fibrótica^{44,45}. O TGF β não apenas estimula a síntese da MEC, mas também controla as demais funções relevantes dos fibroblastos, como a reparação tecidual⁴⁶. Este excepcional papel multifuncional do TGF β traduz-se pela

expressão de receptores para esta citocina em diferentes células, como as inflamatórias, as endoteliais, os queratinócitos, assim como nos fibroblastos, que expressam receptores, além de produzirem este mediador. Sua função biológica é exercida pela interação com dois receptores transmembrânicos conhecidos como tipo I ($T\beta RI$) e tipo II ($T\beta RII$). Inicialmente, ocorre a fosforilação do $T\beta RII$, que, ao ativar o receptor $T\beta RI$, desencadeia a cascata de sinalização nuclear. A ativação nuclear se processa através da fosforilação de mediadores protéicos citoplasmáticos (Família Smad), especialmente as Smads 2 e 3. Baseando-se nestas evidências, entende-se que alguma alteração na sinalização do TGF β via Smad contribua para as alterações fenotípicas dos fibroblastos na ES^{47,48}. Evidências recentes apontam também para a importância da sinalização não SMAD⁴⁹. As moléculas não SMAD ativadas pelo TGF β incluem proteínas quinase, lípidos quinase e a fosfatase calcineurina dependente de cálcio. Outros estudos sugerem que a tirosina quinase c-ABL e a resposta de crescimento precoce 1 (Egr-1) também possuem um papel como mediadores do estímulo das respostas fibróticas induzidas pelo TGF β nos fibroblastos. Por fim, essas novas vias não SMAD interagem entre si e com proteínas SMAD, o que mostra uma rede de sinalização complexa e específica para uma linhagem celular^{2,50}.

Deve-se ressaltar a importância do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), sintetizado pelos fibroblastos sob a influência do TGF β , como o principal responsável pelas lesões fibróticas⁵¹. Além deste fator, os fibroblastos de indivíduos com ES produzem grandes quantidades de interleucina (IL)-6, IL-8 e PDGF, os quais contribuem para o aumento da

síntese de MEC por mecanismo autócrino. O PDGF também pode estimular a síntese de MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) pelos fibroblastos, que, por sua vez, aumentam a síntese de colágeno, além de facilitar a transmigração de células mononucleares através da camada endotelial⁵².

1.3 Vasculopatia

A vasculopatia é reconhecida como um dos fenômenos mais precoces na ES e possivelmente a primeira manifestação da doença⁵³⁻⁵⁶. Pacientes, em geral, apresentam o fenômeno de Raynaud como primeira manifestação, sendo este caracterizado por uma reatividade vascular alterada às temperaturas frias e estresse. O envolvimento vascular é também observado pelo exame de capilaroscopia periungueal e é caracterizado por dilatação, rompimento da arquitetura e redução na densidade capilar, já nos estágios iniciais da doença, podendo preceder alterações fibróticas⁵⁷.

Os eventos iniciais que levam a alterações vasculares são pouco compreendidos, mas acredita-se que os mesmos estão relacionados à lesão do endotélio. Nesse sentido, estudos prévios demonstraram que a apoptose das células endoteliais seria o evento patogênico primário^{28,31}. A progressão da lesão vascular na ES inclui dano e ativação persistente do endotélio, espessamento intimal, e, por fim, estreitamento e obliteração do vaso, que comprometem o suprimento vascular, levando à hipóxia tecidual, com consequente inflamação, fibrose e disfunção do órgão²⁸.

Além disso, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de regulação envolvido em várias etapas da angiogênese fisiológica e

patológica, é intensamente expresso na pele e no soro de pacientes com ES⁵⁸⁻⁶⁰. O VEGF é uma das citocinas que mais contribuem para a patogênese das lesões fibróticas e para as alterações na arquitetura microvascular. Sua expressão é alterada na doença e pode representar o elo entre o desbalanço e a alteração da microarquitetura vascular⁶¹. De fato, alterações endoteliais e vasculares são, sem dúvida, intimamente ligadas a processos fibróticos, como sugerido pelo aumento do processo de neoangiogênese na fibrose pulmonar, tanto em estudos em humanos como em modelos animais⁶².

Sabe-se que as células musculares lisas vasculares proliferam em resposta a fatores de crescimento, resultando na proliferação intimal, na deposição de MEC na parede do vaso e, finalmente, na oclusão completa da luz vascular⁶³. Um processo recentemente reconhecido como transdiferenciação de células endoteliais em fibroblastos subintimal, via transição endotélio-mesenquimal, tem sido sugerido como relevante nesse processo⁶⁴. Esta prolongada perturbação e ativação das células endoteliais, pode levar à disfunção e à perda irreversível da integridade, com desprendimento de células e lesão tecidual persistente. Assim, a doença vascular da ES é caracterizada por alterações funcionais e estruturais das células endoteliais⁵⁷.

1.4 Complicações Pulmonares

As complicações pulmonares, como a fibrose pulmonar (FP) e a hipertensão arterial pulmonar (HAP), são a principal causa de mortalidade na ES⁸.

A FP é detectada clinicamente em 40% dos pacientes com ES, podendo ocorrer nos primeiros cinco anos após o diagnóstico da doença, em particular no grupo de pacientes com ES difusa e que apresenta o anticorpo antitopoisomerase I^{65,66}. O curso evolutivo pode variar de leve e assintomático a quadro grave e debilitante. Aproximadamente, 42% dos pacientes evoluirão a óbito por progressão da doença nos primeiros dez anos do diagnóstico⁸. O tratamento da FP na ES parece ser mais efetivo se iniciado durante o estágio inicial ou antes da instalação da fibrose irreversível⁶⁷.

A FP é caracterizada por inflamação crônica da barreira alvéolo-capilar e por espessamento fibrótico do parênquima pulmonar. O ambiente pró-fibrótico identificado nos pulmões dos pacientes com ES inclui apoptose da célula epitelial e/ou endotelial, infiltrado crônico de células inflamatórias ativadas, ativação alternativa de macrófagos, resposta Th2 preponderante, aumento da produção de IL-4, excesso de produção de diversas citocinas pró-fibróticas e fontes extramesenquimais de miofibroblastos ativados, incluindo a transição epitélio-mesenquimal^{68,69}.

As principais alterações celulares na fase inicial de comprometimento pulmonar na ES são: hiperplasia septal inflamatória, proliferação de fibroblastos α actina+ (fibroblastos ativados) ou miofibroblastos, aumento da densidade de

capilares na microcirculação (neovascularização), e por fim, aumento da atividade endotelial^{70,71}. De fato, estudo de autópsia de tecido pulmonar de pacientes com ES revelou que os dois principais tipos de alterações celulares encontrados em estágios iniciais de FP ativa foram miofibroblastos e neovascularização (formação excessiva de capilares alveolares de forma irregular), acompanhados por um aumento do número de células endoteliais microvasculares^{71,72}. Posteriormente, nos estágios tardios de fibrose pulmonar, a população de miofibroblastos e de células endoteliais nos capilares diminuem. Essas alterações, temporalmente progressivas, reforçam a importância da proliferação de miofibroblastos e das alterações vasculares na compreensão da patogênese da FP associada à ES^{71,73}. Já a HAP associada à ES, tem uma prevalência que varia entre 7,8% a 12%^{74,75} com a pior taxa de sobrevida entre todas as causas de HAP, que é menor que 60% em três anos⁷⁶. Pacientes com ES limitada, normalmente, desenvolvem HAP isolada após 10 a 15 anos do início da doença⁷⁷. Em contrapartida, os pacientes com ES difusa podem desenvolver HAP em qualquer estágio do curso da doença, especialmente quando associada à FP, com um pior prognóstico⁷⁸.

A artéria pulmonar consiste em três principais componentes: a íntima, a média e a adventícia. O remodelamento vascular que ocorre na ES pode acometer qualquer dessas camadas. A camada adventícia pode estar espessada e a camada média pode ter as células musculares lisas hipertrofiadas, mas a lesão que melhor se correlaciona com a HAP clinicamente mais grave é a lesão plexiforme, caracterizada por uma proliferação alterada das células endoteliais⁷⁹. Essas alterações podem levar anos a se instalar.

Atualmente, os marcadores disponíveis para determinar a gravidade da doença e as ferramentas clínicas para avaliar a resposta terapêutica na HAP associada à ES são limitados ou inexistentes.

1.5 Modelos Experimentais

No intuito de compreender o mecanismo fisiopatológico e avaliar as causas envolvidas no desenvolvimento da ES, vários são os modelos experimentais que tentam reproduzir as alterações encontradas, porém nenhum reporta todas as características da doença⁸⁰⁻⁸⁶.

Dentre os modelos animais, estão os que ocorrem naturalmente, em virtude de mutações ocorridas durante a formação (defeitos genéticos). O camundongo *tight skin tipo 1* (TSK1/+) exibe mutação autossômica dominante, com duplicação do gene da fibrilina-1 no cromossomo 2, predispondo ao desenvolvimento de fibrose, com fenótipo de espessamento cutâneo difuso da hipoderme e hiperplasia do subcutâneo severa, pulmão com alterações semelhantes ao enfisema, hipertrofia cardíaca e alargamento do esqueleto⁸⁷⁻⁹⁰. Apesar de não apresentar alterações características da ES, este modelo é bastante estudado por apresentar evidência de autoimunidade e por sua alteração genética, já que a fibrilina-1 tem sido implicada na patogênese da esclerodermia⁹¹.

O camundongo *tight skin tipo 2* (TSK-2/+) é um modelo resultante de mutação induzida no cromossomo 1, sendo esta mutação adquirida autossômica dominante. Os camundongos TSK-2/+ desenvolvem uma série de anormalidades histopatológicas e bioquímicas similares às encontradas

na pele de pacientes com ES. Esses camundongos desenvolvem espessamento importante da derme, com proeminente infiltrado mononuclear na camada inferior da derme e no tecido adiposo subcutâneo⁹². Além disso, é reportada uma alta frequência de anticorpos antitopoisomerase I e anticentrômero, indicando que este modelo desenvolve alterações humorais similares à doença humana; porém também apresenta autoanticorpos não associados à ES⁹³. Portanto, o camundongo TSK-2 pode ser útil para o melhor entendimento da complexa inter-relação entre autoimunidade e fibrose na patogênese da esclerodermia.

Outro modelo que tem sido utilizado é o de uma linhagem híbrida de galinhas UCD-200 e UCD-206 que desenvolvem síndrome fibrótica herdada, com manifestações similares às observadas na ES humana⁹⁴. Essas manifestações incluem apoptose das células endoteliais, infiltrado perivascular de células mononucleares, acúmulo excessivo de colágeno com fibrose tecidual na pele, esôfago, pulmão, coração, rim e testículo, além de desenvolverem alterações sorológicas com produção de autoanticorpos^{95,96}. A grande crítica a este modelo, apesar de reproduzir praticamente todas as manifestações da doença humana, é o fato dele ser um modelo experimental em aves e não em mamíferos.

Existem ainda modelos induzidos por exposição química a agentes como a bleomicina. O modelo de fibrose cutânea induzido por bleomicina é amplamente utilizado na pesquisa básica da esclerodermia e mimetiza alterações inflamatórias precoces da ES. Yamamoto e colaboradores estabeleceram esse modelo em camundongos por meio de injeções

subcutâneas de bleomicina por um período de quatro semanas⁹⁷. Este modelo reproduz alterações histológicas sugestivas de ES, com desenvolvimento de esclerose na derme com infiltrado celular, dano vascular com maior expressão de moléculas de adesão e produção de autoanticorpos específicos, como antitopoisomerase I, anti-U1RNP, e não específicos, como anti-histona⁹⁸⁻¹⁰⁰. As alterações cutâneas são limitadas à área ao redor do sítio de injeção e persistem por seis semanas após o final da indução⁹⁷. A administração de doses elevadas de bleomicina por via subcutânea desencadeia alterações pulmonares, como fibrose com infiltrado celular e dano na arquitetura pulmonar⁹⁸. Outro modelo induzido quimicamente é desencadeado por meio de injeções intradérmicas de agentes geradores de ânions peroxinitritos (ONOO^-) em camundongos, induzindo alterações similares à ES limitada, com fibrose cutânea limitada, produção de anticorpos anticentrômero e ausência de envolvimento pulmonar. Já a injeção intradérmica de agentes geradores de radicais hidroxil (OH) ou ácido hipocloroso (HOCl) induz alterações características da ES difusa, como fibrose cutânea e pulmonar, lesão renal característica e produção de anticorpo específico, o antitopoisomerase 1¹⁰¹. Esses modelos têm sido utilizados para estudo de fases inflamatórias e fibróticas, porém não apresentam dano vascular característico da ES.

Outros modelos de ES são induzidos após transplante de células imunes, originando doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), com manifestações semelhantes à ES humana. A transferência de células esplênicas dos camundongos B10.D2 para animais Balb/C irradiados induz a

fibrose de pele e de pulmão e a infiltrados de células T, monócitos e macrófagos^{102,103}. Já a transferência de células esplênicas dos camundongos B10.D2 para camundongos RAG-2KO BALB/c causa lesão vascular com vasoconstrição e expressão alterada de ET-1, inflamação, ativação do sistema imune com desenvolvimento de autoanticorpos e fibrose sistêmica, especialmente na derme, rim, fígado e trato gastrointestinal, mas com poucas repercussões no coração e pulmão¹⁰⁴. Este modelo apresenta muitas similaridades com a doença humana, porém é um modelo pouco utilizado, já que requer habilidades técnicas sofisticadas para o transplante e cuidados especiais para evitar infecções.

Camundongos geneticamente modificados com manipulações ou interrupções de importantes vias de sinalização permitem a determinação dos mecanismos celulares e moleculares, que desencadeiam eventos patogénéticos chaves de doenças. Nos últimos anos, modelos murinos mutantes ou transgênicos foram gerados na tentativa de criar um modelo animal que recapitulasse a complexa patogênese e as características patológicas de ES humana^{83-86,105}.

Dentre os modelos de camundongos transgênicos, o modelo relacionado ao antígeno Fos (Fra-2), exibe microangiopatia e fibrose progressiva da pele, precedidos por apoptose das células endoteliais, além de apresentar grave fibrose pulmonar, acompanhada de vasculopatia proliferativa¹⁰⁶. O fator de integração 1 da leucemia de Friend (Fli-1) tem um papel importante em modular células endoteliais durante o desenvolvimento vascular. Os camundongos knockout de Fli1 nas células endoteliais,

apresentam alterações nos vasos cutâneos com grande comprometimento da sua integridade, mimetizando as alterações microvasculares observadas na ES¹⁰⁷. O modelo dependente-TGF β (receptor II do TGF β deficiente de quinase) apresenta fibrose da derme e do pulmão, aumento da espessura da camada adventícia e vasoreatividade alterada com fibrose cardíaca¹⁰⁸. Outro modelo, envolvendo a via do TGF β (T β RI^{CA}/Cre-ER), desenvolve estágios avançados de alterações fibróticas, com nítida fibrose generalizada da derme e aumento da espessura das paredes dos vasos das pequenas artérias do pulmão, do rim e da glândula adrenal⁴⁶. Por fim, os camundongos transgênicos caveolina-1-/- apresentam um fenótipo de fibrose da derme e de fibrose pulmonar, com espessamento dos septos alveolares, redução dos espaços alveolares e hiper celularidade intersticial. Além disso, esse modelo apresenta hipertensão pulmonar grave, com hipertrofia do ventrículo direito¹⁰⁹.

Embora todos esses modelos animais desenvolvam alterações fibróticas da pele semelhantes às de pacientes com ES, um modelo que contempla todos os componentes patogénéticos e a de fibrose, em tecidos habitualmente s características histológicas e bioquímicas da esclerodermia humana ainda não está disponível.

1.6 Modelo Induzido Por Meio da Imunização com COLV

Em 2001, nosso grupo apresentou um interessante modelo experimental de ES, ao imunizar coelhas saudáveis da linhagem Nova Zelândia com colágeno do tipo V (COLV) humano¹¹⁰.

Estes animais desenvolvem quadro clínico e histológico compatíveis com o observado na ES humana. O primeiro órgão analisado foi o pulmão, no qual as alterações morfológicas visualizadas aos 75 dias e 120 dias, foram muito semelhantes às encontradas em doenças difusas do tecido conjuntivo, com a presença de intenso processo inflamatório em vasos, brônquios e interstício^{110,111}.

Posteriormente, demonstrou-se que as alterações histológicas observadas nos animais de 75 dias e 120 dias, não estavam restritas ao tecido pulmonar, mas ocorriam em outros órgãos, como coração, esôfago, rim, sinóvia, cartilagem e pele¹¹²⁻¹¹⁶. A identificação de fibrose, em tecidos habitualmente acometidos na ES, reforçou a possibilidade de que este seria um novo modelo experimental de esclerodermia¹¹².

No comprometimento cardíaco, alterações ocorreram principalmente no interstício, com maior depósito de colágeno entre as fibras musculares, principalmente nos animais de 120 dias. As alterações esofágicas observadas nos animais de 75 dias e 120 dias eram caracterizadas por depósito de colágeno na camada submucosa e perivascular e atrofia da muscular. O parênquima renal apresentava discreta proliferação mesangial, espessamento da membrana basal e depósito de colágeno ao redor dos vasos do interstício renal, mais visível nos animais de 120 dias. Quanto às alterações da membrana

sinovial, foi observada estratificação do epitélio de revestimento e intenso remodelamento com depósito de colágeno no tecido conjuntivo subsinovial e ausência de infiltrado inflamatório nos coelhos de 75 dias e 120 dias. Por fim, a pele apresentava alterações características da ES, com aumento de depósito de colágeno na derme superficial e profunda e atrofia dos anexos e redução do tecido gorduroso. Essas alterações iniciaram-se nos animais de sete dias e foram progressivas até 150 dias^{114,116}.

Surpreendentemente, também houve surgimento tardio de autoanticorpos nos animais imunizados com COLV, como os anticorpos antinucleares e o anticorpo específico da doença, o antitopoisomerase I. Além desses anticorpos, também foram observados anticorpos anticolágeno do tipo I e III, e anticorpos anticélula endotelial¹¹⁷.

Curiosamente, as alterações morfológicas encontradas na ES induzida pela imunização por COLV não ocorreram quando da administração de outros tipos de colágenos, como os colágenos dos tipos I e III, frequentemente aumentados nos processos de fibrose pulmonar.

1.7 Colágeno do Tipo V

O COLV, membro da subfamília fibrilar dos colágenos, foi descrito pela primeira vez por Burgeson e colaboradores, em 1976, após sua extração do tecido placentário humano¹¹⁸.

O COLV é quantitativamente o menor componente da maioria dos tecidos conjuntivos, distribuindo-se principalmente na córnea¹¹⁹⁻¹²¹, no fígado¹²², no baço¹²³, no pulmão e na pele¹²¹.

No pulmão, o COLV é o menor colágeno, expresso na forma de fibrilas muito finas¹²⁴, localizado no tecido conjuntivo peribronquiolar¹²⁵, no interstício alveolar¹²¹ e na membrana basal do capilar¹²⁵, sendo sintetizado por fibroblastos, miofibroblastos e células do músculo liso¹²¹.

Além de estar presente na ligação entre a membrana basal dos vasos e do tecido conjuntivo, o COLV estabelece associação com outros tipos de colágenos, como os colágenos dos tipos I e III, que estão presentes de forma abundante na pele e no interstício pulmonar, formando fibras heterotípicas¹²⁶⁻¹²⁸. As fibras heterotípicas, formadas pela associação dos colágenos I, III e V, são importantes proteínas, que participam na preservação e na integridade do tecido conjuntivo presente nos vasos^{119,126}. Dentre as funções do COLV, além da formação de fibras heterotípicas, estão o controle da fibrilogênese e a regulação do tamanho das fibras de colágeno¹²⁹.

O COLV possui algumas características moleculares capazes de torná-lo funcionalmente diferente do resto dos colágenos fibrilares intersticiais, sendo uma delas referente a sua biossíntese. Na síntese da maioria dos colágenos fibrilares, ocorre perda dos domínios globular e telopeptídeos (NH₃ e COOH), regiões conhecidamente imunogênicas da molécula. No COLV, estes domínios são preservados, proporcionando um caráter imunogênico¹³⁰.

Recentemente, o COLV foi considerado um autoantígeno em potencial, capaz de induzir rejeição de enxerto de pulmão em modelo murino de transplante pulmonar. Os autores sugeriram que o processo inflamatório

gerado durante o fenômeno de rejeição do transplante ocasionaria a exposição de fragmentos de COLV ocultos, devido à ação de metaloproteases, originando uma doença de enxerto versus hospedeiro, direcionada para epítomos desta molécula^{131,132}. Além disso, este grupo demonstrou que a tolerância oral com COLV inibiu a rejeição aguda do enxerto de pulmão, impedindo o desenvolvimento de bronquiolite obliterante, principal causa de morte nos transplantes de pulmão, tanto em modelo experimental de camundongos, como em humanos^{133,134}.

De forma similar, foi demonstrado que a tolerância nasal com COLV no modelo de ES induzido pelo COLV (coelhos de 210 dias) promoveu redução do depósito de colágeno na pele e no pulmão dos animais e diminuição da expressão de citocinas pró-fibróticas^{135,136}.

Interessantemente, em estudo com biópsias pulmonares de pacientes com FP associada à ES, foi observado aumento significativo de COLV, permeando a parede vascular e septal. Este colágeno apresentava sua histoarquitetura alterada, mudando a estrutura fibrilar de fibras tipicamente finas e homogêneas para densas e grossas, muito diferentes de sua apresentação habitual. Outro resultado de grande relevância foi o encontro da associação entre o depósito de fibras de COLV atípicas, presente nos vasos, e a intensidade da apoptose endotelial, a ruptura da membrana basal e a alteração de provas funcionais do pulmão¹³⁷.

1.8 Justificativa do Estudo

Estudos realizados no LIM-17, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), mostram haver grandes semelhanças morfológicas e imunológicas entre os achados no modelo experimental de ES induzido pelo COLV e a doença humana, tornando esse modelo de grande importância para a compreensão da patogênese e a aplicação de protocolos terapêuticos. No entanto, o envolvimento vascular neste modelo de ES ainda não foi abordado. Neste sentido, esse trabalho tem como objetivo estudar a vasculopatia, com ênfase nas lesões endoteliais no pulmão, considerado o órgão sistêmico que melhor representa as modificações vasculares na ES.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a vasculopatia pulmonar no modelo experimental de ES induzido em coelhos após imunização com COLV, procurando-se analisar temporalmente as diferentes etapas envolvidas entre a ativação endotelial e o remodelamento matricial.

2.2 Objetivos Específicos

a) Atividade vascular das artérias pulmonares:

- Avaliação histomorfométrica das artérias pulmonares pela coloração de hematoxilina-eosina.
- Avaliação da ultraestrutura vascular pela microscopia eletrônica.
- Análise da densidade vascular do endotélio pela quantificação da expressão de CD31 por imunohistoquímica.
- Análise da apoptose *in situ* no endotélio vascular pela quantificação da expressão de caspase-3 por imunohistoquímica.
- Análise da atividade endotelial pela quantificação da expressão de endotelina-1 e VEGF por imunohistoquímica.
- Estudo da reatividade vascular em vaso isolado por curva dose-resposta de acetilcolina e noradrenalina.

c) Remodelamento da MEC do tecido pulmonar:

- Expressão do mRNA para as cadeias dos colágenos I, III e V pela PCR em tempo real.
- Determinação do conteúdo de colágeno por meio da dosagem da 4-hidroxiprolina.

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados coelhos fêmeas, com idade de quatro semanas, peso de 2500 g, da linhagem Nova Zelândia brancos (NZW), provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os animais ficaram em observação por uma semana até o início do experimento, sendo mantidos durante o período de realização das pesquisas no Biotério de manutenção do Departamento de Clínica Médica da FMUSP, com ciclo de 12h claro/12h escuro, à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, recebendo água e ração padronizada *ad libitum*.

O trabalho foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP (Protocolo nº 0963/08). A utilização de animais no protocolo experimental deste projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

3.2 Modelo Experimental de ES por Imunização com COLV

Os coelhos NZW ($n = 18$) foram imunizados com 1 mg de COLV humano^a, emulsificado em 1 mL de adjuvante completo de Freund^b, por via subcutânea (SC), na região do dorso do animal. Após quatro semanas, os coelhos receberam dose idêntica de COLV e, posteriormente, receberam dois reforços, por via intramuscular (IM), de 1mg de COLV, emulsificado em 1 mL de adjuvante incompleto de Freund (AFI), em intervalo de 15 dias. Coelhos ($n = 18$) da mesma linhagem, sexo e peso, inoculados com ácido acético 10 mM, emulsificado em adjuvante de Freund, seguindo o mesmo protocolo, foram utilizados como controles.

Os animais imunizados (IM-COLV) e controles (CT) foram divididos em grupos: um primeiro grupo ($n = 12$), sacrificado após sete dias da primeira imunização (Grupo 7 dias); um segundo grupo ($n = 12$), sacrificado após 75 dias da primeira imunização (Grupo 75 dias) e um terceiro grupo ($n = 12$), após 210 dias (Grupo 210 dias) (Figura 1).

Figura 1 - Protocolo de imunização dos coelhos com COLV

^a Sigma Chemical CO.; St Louis, Missouri, EUA.

^b AFC; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA.

3.3 Obtenção dos Pulmões

Os animais foram anestesiados com uma dose intramuscular de ketamina (50mg/kg,)^c e xilazina (5mg/kg,)^d, seguido de tricotomia da região torácica anterior e assepsia com iodo polvidine. Após o preparo inicial, sob anestesia e em plano cirúrgico, foi realizada uma incisão na linha mediana ventral, sendo retirado o plastrão torácico com a ajuda de osteótomo, para melhor acesso do conteúdo mediastinal (coração, pulmão e vasos). Estes órgãos foram removidos em bloco, retirando-se a artéria pulmonar cuidadosamente, por meio de transecção, para posterior teste de reatividade vascular. O pulmão direito foi dissecado, sendo o lobo inferior cortado em pequenos pedaços, os quais foram conservados em nitrogênio líquido para futuros procedimentos de biologia molecular. Fragmentos de 1 mm² do lobo inferior do pulmão direito também foram imersos em glutaraldeído para posterior análise ultraestrutural. O pulmão esquerdo foi canulado, por meio do brônquio direito, e preenchido com solução de formol 10% à pressão de 30 cm H₂O. Após completo preenchimento deste pulmão, o mesmo foi imerso em solução de formol 10% por seis horas, sendo posteriormente transferido para solução alcoólica a 70%. A seguir, o lobo inferior foi cuidadosamente seccionado em fatias de 2 a 3 cm de espessura e processado segundo as técnicas convencionais de histologia.

^c Ketalar, Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil.

^d Rompun, Bayer SA, São Paulo, SP, Brasil.

3.4 Análise dos Vasos Pulmonares

Para a análise da arquitetura dos vasos, lâminas com cortes de pulmão de 4 µm de espessura foram corados segundo técnicas padronizadas para coloração de hematoxilina e eosina. Essas lâminas também foram utilizadas para o estudo da espessura da parede e do lúmen vascular. Em cada lâmina, foram pesquisadas todas as artérias com diâmetro relativo maior que 0,6. Os vasos foram analisados utilizando-se microscópio óptico Olympus^e, com aumento de 200X. Os cortes de tecidos com vasos foram capturados por meio digital e as áreas externa e interna do lúmen vascular, assim como as medidas do perímetro dos vasos, foram determinadas por meio da medida dos contornos externo e interno da parede vascular, utilizando-se um programa de análise de imagens^f. O sistema analisador de imagens consiste em uma câmera digital Olympus^g, monitorada por meio de um sistema digital^h e conectada a um computadorⁱ. As imagens foram processadas pelo analisador de imagens. O espessamento da parede vascular foi calculado pela relação do raio maior ($R = \sqrt{\text{área externa}/\pi}$) e do raio menor ($r = \sqrt{\text{área interna}/\pi}$) de cada vaso. Para obter a média de espessamento da parede dos vasos de cada animal, foi calculada a média de todos os vasos analisados por lâmina. Analogamente, para obter a média da área do lúmen dos vasos de cada animal, foi calculada a média da área do lúmen de todos os vasos por lâmina.

^e BX51 - Tóquio, Japão.

^f Image Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, EUA.

^g Q-Color 5, Surrey, Canada.

^h Oculus TCX, Coreco, Inc.; St. Laurent, Quebec, Canada.

ⁱ Pentium 3000Mhz.

3.5 Imuno-histoquímica

Os anticorpos específicos para CD31, VEGF, ET-1 e caspase-3 utilizados para este estudo estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica

Anticorpo	Diluição	Fonte	Clone
CD31 monoclonal	1/40	Dako cytomation, Glostrup, Denmark	JC70A
VEGF policlonal	1/500	Santa Cruz Biotecnologia, Inc, Santa Cruz, Ca	
Caspase-3 policlonal	1/400	Santa Cruz Biotecnologia, Inc, Santa Cruz, Ca	
ET-1 policlonal	1/1200	Santa Cruz Biotecnologia, Inc, Santa Cruz, Ca	

Cortes de tecido pulmonar de 4 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas^j em suporte adequado. O processo de desparafinização foi feito ao se colocar as lâminas em xilol quente, na estufa a 60 - 65° C, durante 20 minutos, e passadas em três banhos de xilol frio, de 10 minutos cada. Para hidratação dos cortes, as lâminas foram submetidas a quatro banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95% e um banho de álcool 70%. Em seguida, foram lavadas em água corrente, por 10 minutos, água deionizada e deixadas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, por 15 minutos. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos, realizada em alta temperatura, em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0, em panela a vapor^k a 125°C, por um minuto, e pressão de aproximadamente 25 mmHg. Apenas para o VEGF, a recuperação dos sítios antigênicos foi feita por digestão com tripsina, por 10 minutos, a 37°C. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada 3%, sendo posteriormente lavada

^j Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA.

^k Pascal, Dakocytomation, Model: 2800, EUA.

em água corrente, água destilada e PBS. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com imersão das lâminas em caseína^l diluída 1% em PBS, por cinco minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em 1% de albumina de soro bovino (BSA), por 24 horas, a 4°C. Posteriormente, estas foram incubadas com o anticorpo secundário Vector^m e reveladas, utilizando-se como cromógeno a Diaminobenzidina (DAB)ⁿ. Finalmente, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris^o.

3.6 Quantificação do colágeno por meio da dosagem da 4-hidroxiprolina

Para determinação do teor de colágeno no tecido pulmonar dos coelhos CT e IM-COLV, utilizamos o método colorimétrico de Bergmann e Loxley, 1963, que consiste na determinação da 4-hidroxiprolina, aminoácido específico do colágeno, e que corresponde a aproximadamente 13,4% da sequência de aminoácidos desta proteína¹³⁸. Este método consta de quatro processos: hidrólise ácida, neutralização, oxidação e coloração, que serão descritos a seguir.

^l Synth, São Paulo, Brasil.

^m Vectastain Elite ABC-kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA Linaris.

ⁿ Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha.

^o Merck, Darmstadt, Alemanha.

3.6.1 Hidrólise ácida

Previamente à hidrólise ácida, as amostras de tecido pulmonar foram pesadas e liofilizadas^p a -50°C. Para a realização da hidrólise proteica, os tecidos liofilizados foram solubilizados em 5 mL de HCl 6N, em ampolas de vidro, seladas em maçarico, e mantidos durante 22 horas, a 100°C.

3.6.2 Neutralização

As amostras hidrolizadas (peso médio de 4 mg/mL) foram filtradas com papel Waltman n° 1, sendo separado 1 mL do filtrado para a neutralização do pH entre 6,5 e 7,0 com solução 100% saturada de hidróxido de lítio. Para a visualização da mudança de pH, foi utilizada solução de fenolftaleína 1% em etanol absoluto; para o monitoramento do pH, foi usado o papel indicador de pH universal.

3.6.3 Oxidação

A oxidação foi realizada utilizando-se 1 mL das amostras neutralizadas. Para melhor controle da reação, foram utilizados os seguintes padrões: solução de 4-hidroxi prolina^q na concentração de 4 µg em 1 mL de água destilada e controle branco, contendo 1 mL de água destilada.

^p liofilizador Edwards, Modulyo.

^q Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA.

A reação realizou-se ao serem adicionados 2 mL de isopropanol^r às amostras e aos padrões, seguidos de 1 mL de cloramina T 7%^s, diluída em solução oxidante, e incubação de quatro minutos a temperatura ambiente.

3.6.4 Coloração

Para a coloração e a visualização da reação, foram acrescentados 2 mL do reagente de Ehrlich^t às amostras e aos padrões, sendo mantidos em banho Maria a 60°C, por 20 minutos.

3.6.5 Leitura e resultados

A densidade óptica das amostras foi medida em espectrofotômetro^u a 560 nm, subtraindo-se do valor obtido a absorvância registrada no controle branco da amostra.

Os resultados foram expressos em µg de 4-hidroxiprolina por mg de tecido. Para a obtenção dos resultados, executou-se o seguinte cálculo:

$$R = K \times VF \times DO / DI \quad \text{onde } K = CP / DP, \text{ sendo:}$$

R = resultado
 K = constante de diluição da amostra
 VF = volume final da amostra
 DO = densidade óptica da amostra
 DI = diluição inicial da amostra
 CP = concentração do padrão (4 mcg/mL)
 DP = densidade óptica do padrão

^r Merck, Darmstadt, Alemanha.

^s Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA

^t Para-dimetilaminobenzaldeído P.A., Ácido perclórico P.A., Isopropanol

^u Modelo DU 640, Beckman Coulter, EUA.

3.7 Avaliação Morfométrica

As lâminas imunomarcadas de amostras de pulmão dos coelhos IM-COLV e CT foram analisadas usando um microscópio de luz convencional^v, em um aumento de 400x. Utilizando-se o método de morfometria convencional foi avaliada a densidade de células imunomarcadas no endotélio¹³⁹. Para a análise morfométrica, foi feita leitura das lâminas, sem que o pesquisador tivesse o conhecimento do grupo experimental que estava sendo analisado. Por meio da utilização de um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular do microscópio óptico, foi quantificado o número de pontos que incidiram nas células endoteliais do tecido pulmonar. A contagem foi realizada em 10 vasos de pequeno calibre (diâmetro < 20µm), cinco vasos de médio calibre (20-40 µm de diâmetro) e cinco vasos de grande calibre (diâmetro > 40 µm) e calculada a média dos vasos de diferentes calibres por lâmina. A densidade de células imunomarcadas, foi determinada pelo cálculo das células coradas e não coradas, para obter um resultado final, como uma porcentagem de estruturas coradas nas células endoteliais. A porcentagem (P) de pontos marcados no compartimento de referência, para cada antígeno estudado, foi expressa conforme a fórmula:

$$P = (P_{ix}100)/P_t$$

Onde PI é o número de pontos que incide sobre a positividade dos marcadores imuno-histoquímicos e PT é o número total de pontos analisados.

^v Nikon Eclipse 50i, Badhoevedorp, Países Baixos.

Figura 2 - Imagem do retículo que é acoplado a uma das oculares do microscópio

3.8 Microscopia Eletrônica

Os pequenos fragmentos (1 mm x 1 mm) de pulmão foram fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2, por 60 minutos, seguidos de uma 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 uranilo aquoso por 24 horas. Após esse procedimento, as amostras foram desidratadas em concentrações de acetona e embebidas em resina Araldite. Cortes ultrafinos foram obtidos com uma faca de diamante em micrótomo LKB Ultratome^w. Posteriormente, estes foram colocados em grelha de cobre^x e contrastados com acetato de uranilo e citrato de chumbo. Os espécimes foram estudados e micrografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão^y, operando a 80 kV. As amostras foram codificadas para garantir coleta de dados imparciais.

^w Leica, Deerfield, IL, EUA.

^x 200-mesh; Ladd Research Industries, Burlington, EUA.

^y Modelo Philips Tecnai 10 - Philips, Munich, Alemanha.

3.9 Reatividade Vascular em Artéria Pulmonar, Por Curva Dose-Resposta de Acetilcolina e Noradrenalina

Após toracotomia e dissecação, a artéria pulmonar foi retirada, lavada em solução de Krebs-Henseleit (CaCl_2 1,6 mmol/L, MgSO_4 1,17 mmol/L, EDTA 0,026 mmol/L, NaCl 130 mmol/L, NaHCO_3 14,9 mmol/L, KCl 4,7 mmol/L, KH_2PO_4 1,18 mmol/L, glicose 11 mmol/L), limpa, removendo-se o tecido gorduroso da camada periadventícia, e seccionada em fragmentos em forma de anéis de 4-5 mm. Os anéis de artéria pulmonar foram colocados em cubas para órgão isolado com 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, aquecidos a 37°C, e aerados com carbogênio (O_2 95%, CO_2 5%). Estes segmentos permaneceram suspensos por um período de estabilização de 60 minutos, com uma tensão de 2 g mantida por duas hastes de aço inoxidável que tracionaram os anéis; a cada 20 minutos a solução de Krebs-Henseleit foi trocada e a tensão reajustada. A haste inferior foi fixada na própria cuba de órgão isolado e a superior permaneceu conectada a um transdutor de tensão. A tensão isométrica foi medida por meio da força de deslocamento do transdutor e digitalizada, usando um sistema de gravação multicanal, ligado à unidade de aquisição MP100 e a um programa de análise^z. Após o período de estabilização, foi realizada pré-contração com noradrenalina ($1 \cdot 10^{-7}\text{M}$), induzindo 60-70% da contração máxima e resultando em uma tensão, cuja magnitude da vasodilatação subsequente é máxima. Assim, foram construídas curvas dose- resposta cumulativa a acetilcolina, com aumento progressivo das concentrações ($1 \cdot 10^{-8}$ a $3 \cdot 10^{-6}\text{M}$). Desta forma, a reatividade vascular foi estudada, utilizando-se curvas dose-resposta de

^z Biopac Systems, Goleta, CA, EUA.

noradrenalina e acetilcolina, porcentagem de relaxamento induzido a cada dose de acetilcolina, e também pela medida da resposta máxima e sensibilidade a acetilcolina. A resposta máxima a acetilcolina foi obtida da média e do desvio padrão da resposta máxima para cada experimento. A sensibilidade a acetilcolina foi estimada, utilizando-se EC_{50} , ou seja, a dose de acetilcolina que produziu 50% da contração máxima em cada experimento.

Figura 3 - Banho de órgão isolado conectado a um transdutor de tensão

3.10 Biologia Molecular

3.10.1 Pulverização do Material e Extração do RNA total

As moléculas de RNA foram extraídas de fragmentos de tecido pulmonar provenientes de coelhos CT e IM-COLV, criopreservados a -80°C, usando o reagente Trizol[®] (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina^{aa}), de acordo com as instruções do fabricante, a partir de aproximadamente 100 mg de tecido congelado, o qual foi colocado em tubo contendo 1 mL de Trizol[®], sendo pulverizado com o homogeneizador de tecidos Precellys[®]24^{bb}. O tecido foi pulverizado por 10 minutos a temperatura ambiente em seguida acrescentado 0,2 mL de clorofórmio homogeneizado por inversão e deixado a temperatura ambiente por cinco minutos. Ao término, o material foi submetido à centrifugação a 12.000 g por 20 minutos a 4°C, transferindo-se depois o sobrenadante para um tubo novo com 0,6 mL de álcool isopropílico, permanecendo em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida, levada a centrifugação por 15 minutos a 12.000 g e a 4°C. Descartamos o sobrenadante e lavamos com 1 mL de etanol 75% e centrifugamos a amostra por cinco minutos a 7.500 g a 4°C, descartando em seguida, o sobrenadante e deixando os tubos escorrendo sobre papel absorvente até secar o pellet. Após secagem do precipitado, este foi ressuspensionado em 25 µl de água DEPC^{cc}, e incubado por 10 minutos a 55°C para permitir completa dissolução do RNA.

^{aa} Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA.

^{bb} Bertin, França.

^{cc} Dietilpirocarbonato, Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA.

3.10.2 Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria

A avaliação da concentração e do grau de pureza das amostras de RNA, foi feita a partir de 1 µL da amostra de RNA, dissolvido em 199 µL de H₂O miliQ, sendo utilizado como referência 1µL de H₂O DEPC, diluído em 199 µL de H₂O miliQ. A leitura no espectrofotômetro *Gene Quant pro^{dd}* foi determinada pela leitura da absorbância, em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. A relação entre as leituras obtidas (260/280) deve estar entre 1,7 e 2,0 para obtenção de RNA com alto grau de pureza.

3.10.3 Avaliação da integridade do RNA por meio de eletroforese em gel de agarose

A qualidade do RNA extraído foi controlada por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo MOPS 1x e 5,1% de formaldeído, verificando-se, assim, a integridade das bandas de RNA ribossômico 18S e 28S, que indicam e confirmam a presença de RNA. As amostras de RNA foram preparadas com 5 µL de tampão de aplicação para RNA, 1 µL de brometo de etídio e 1 µL do RNA extraído. A corrida eletroforética em gel de agarose foi realizada em tampão MOPS 1x e voltagem constante de 60 volts, a temperatura ambiente.

^{dd} Amersham Bioscience, Cambridge, Sweden.

3.10.4 Reação de transcriptase reversa (RT) para obtenção de cDNA

A fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 µg de RNA total diluídos em 12 µL de água DEPC e ao qual foram acrescentados 1 µL de oligonucleotídeos iniciadores (0,5 µg/µL)^{ee} e 1 µL de dNTP mix (10 nM). A mistura foi aquecida a 65°C, por cinco minutos e, a seguir, colocada imediatamente no gelo, por dois minutos. Foi adicionado 4 µL do tampão 5x First-Strand da Super Script III (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)^{ff}, 1 µL de ditioneitol (DTT) a 0,1M^{gg} e 1µL da enzima Super Script III Reverse Transcriptase (200U/µL)^{hh}, seguido por aquecimento a 55°C, por uma hora. Após uma hora de tratamento com a referida enzima, a temperatura foi elevada para 70°C, por 15 minutos, para inativação da enzima. A síntese da primeira fita de cDNA obtida foi estocada a -20°C até a amplificação por meio da Reação em Cadeia da Polimerização (PCR) em tempo real.

3.10.5 Seleção e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Foram selecionados três genes de interesse (específicos para coelhos) para este estudo, sendo eles: do colágeno tipo I (COLI), do colágeno tipo III e do COLV. Além destes, foi selecionado também um gene constitutivo (gene cuja expressão não apresente variação e utilizado para avaliação da qualidade da reação como normalizador interno), o gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH). O desenho dos *primers* pode ser visualizado no Quadro 2.

^{ee} Amersham Biosciences, Inglaterra.

^{ff} Invitrogen, EUA.

^{gg} Invitrogen, EUA.

^{hh} Invitrogen, EUA

Quadro 2 - Sequência e descrição dos genes selecionados para o estudo

Gene Sequência gênica	Tamanho do produto de cDNA	Código de acesso
COL I (<i>primer right</i>) 5' CTT GGG GTT CTT GCT GAT GT 3' (<i>primer left</i>) 5' GGA CCT CAA GAT GTG CCA CT 3'	178 pb	AY633663
COL III (<i>primer right</i>) 5'ATG TGT TTG GTG GAA CAG CA 3' (<i>primer left</i>) 5' TGG CCC TGT TTG CTT TTT AT 3'	204 pb	S83371
COLV (<i>primer right</i>) 5' GTC CCC CTC AAA CAC TTC CT 3' (<i>primer left</i>) 5' TCT CAG CGT CCA CAA GAA AA 3'	154 pb	AF451329
GAPDH (<i>primer right</i>) 5' GTG AGT TTC CCG TTC AGC TC 3' (<i>primer left</i>) 5' AGG TCA TCC ACG ACC ACT TC3'	202 pb	AB231852

Os *primers* foram desenhados a partir da sequência de mRNA descrita no endereço <www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. A sequência do mRNA foi analisada no endereço <<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgblat>> e então foi escolhida a região de interesse para a construção do *primer*, ou seja, uma região com presença de grandes íntrons entre éxons de interesse contidos no DNA do gene. O desenho dos *primers* foi realizado utilizando-se o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi>) e a homologia dos *primers* construídos em relação às diversas sequências depositadas foi verificada no endereço <www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Também foi verificado se os *primers* selecionados formavam estruturas estáveis indesejadas (secundárias) e para isso foi utilizado o programa OligoTech versão 1.00, Copyright (1995).

3.10.6 Padronização da reação em cadeia da polimerização em tempo real quantitativa (qRT-PCR) pelo sistema SYBR Green

A reação de qRT-PCR foi realizada em um termociclador Rotor Gene RG-3000ⁱⁱ. A obtenção e a análise dos dados foram realizadas pelo software Rotor Gene 6.0, criado pela Corbett Research. Entretanto, antes de se iniciar os experimentos de quantificação, foi realizada uma padronização do método para análise da expressão gênica do COL I, COL III, COLV e GAPDH, que envolveu: o teste de eficiência de amplificação dos *primers* e a determinação da quantidade de cDNA molde.

Para determinar a eficiência de amplificação dos *primers*, foram realizadas curvas de amplificação, utilizando-se quantidades conhecidas de cDNA em cada reação. A partir da leitura feita na etapa de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA, foram realizadas diluições seriadas: 1000 ng/μL; 500 ng/μL; 250 ng/μL e 125 ng/μL. Ao final da reação, foi verificada a relação entre a quantidade inicial de amostra e o número de ciclos obtidos em uma determinada fluorescência (Ct). Espera-se que a cada ciclo dobre a quantidade de produto formado (2 Ct). Tendo definido o nível de fluorescência e coletado o número de ciclos necessários para amplificar quantidades diferentes de cDNA inicial, é possível correlacionar estes dois fatores. A inclinação da reta obtida determina a eficiência de amplificação da reação. O ideal é que a reação apresente 100% de eficiência (duplicação dos produtos de PCR a cada ciclo) ou com variações de 10% para mais ou menos. Por meio destas análises, foi possível determinar a melhor quantidade de amostra para os *primers* desenhados (Figura 4).

ⁱⁱ Corbett Research, 2004

Figura 4 - Representação do teste de eficiência: primers

Assim, a técnica de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se, para um volume final de 20 μ L: 5 μ L de cDNA a 500ng de cada amostra, 1 μ L de cada *primer* à concentração de 10 mM e 15 μ L de Platinum[®] SYBR[®] Green q PCR Super Mix-UDG^{jj}.

As condições determinadas para a reação foram: 40 ciclos, cinco minutos a 95°C (aquecimento inicial), 60 segundos a 95°C (desnaturação), 60 segundos a 60°C (anelamento) e 60 segundos a 72°C (extensão); estas condições foram determinadas para os quatro *primers* desenhados.

Utilizamos o sistema de detecção por SYBR Green, o qual se baseia no uso de uma molécula fluorescente, denominada SYBR Green I, que quando intercalada à dupla fita do DNA, passa a ser detectável. Durante os ciclos iniciais da reação de PCR, o sinal de fluorescência emitido pelo SYBR Green é fraco para ser detectado, isto é, não ultrapassa o sinal de fluorescência de fundo. Entretanto, no decorrer dos ciclos da reação de PCR, há o aumento do produto amplificado e, por consequência, o aumento

^{jj} Invitrogen, Brasil

do sinal de emissão de fluorescência, que passa a ser detectável. Sendo assim os valores são quantificados depois de um número fixo de ciclos, o que representa a quantidade final de cada produto acumulado, diferindo assim da reação de PCR convencional. A metodologia que utiliza o SYBR *Green I* exige cuidadosa padronização, uma vez que este fluoróculo intercala-se a qualquer molécula de dupla fita presente na reação. A especificidade da detecção de fluorescência com SYBR *Green I* pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos, causada pela concentração inadequada de oligonucleotídeos e pela formação de produtos de amplificação inespecíficos. Todos estes fatores levam à formação de moléculas de dupla fita não esperadas, as quais incorporam o SYBR *Green I* e têm sua fluorescência registrada.

Todas as amostras foram analisadas pelo programa Rotor-Gene 6 System^{kk} e a média dos valores de ciclos limiares de cada amostra (Ct) é utilizada para quantificação da expressão dos genes de interesse.

Neste método de detecção, a confirmação da especificidade da amplificação é realizada pela análise da curva de desnaturação ou curva de *melting*, onde se analisa a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, possibilitando determinar a temperatura de desnaturação (*Melting temperature* - *Tm*) de cada fragmento resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui uma *Tm* específica, permitindo a diferenciação entre os produtos resultantes.

^{kk} Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália.

A análise da expressão gênica por meio de PCR quantitativo representa uma quantificação relativa dos genes de interesse, então requer um controle endógeno, ou seja, a presença de um gene cuja expressão não apresente variação estatisticamente significativa entre as amostras analisadas. Então foram utilizados genes cuja expressão foi avaliada e tiveram menor variação, ou seja, maior estabilidade. Os dados foram normalizados com base na expressão dos genes constitutivos, e analisados utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (141). O ΔCt é a diferença entre os Ct do gene alvo e gene de referência de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta Ct$ corresponde à diferença entre o ΔCt do calibrador e da amostra.

3.11 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram tabulados e analisados com uso do *software* estatístico SPSS versão 18.0^(II). Foi realizada verificação da normalidade de distribuição dos dados, utilizando testes Kolmogorov-Smirnov, sendo que as distribuições foram consideradas normais.

Os valores de espessamento e área do lumen, no Grupo 210, foram descritos segundo calibre do vaso e coelhos (CT e IM-COLV), e descritos os valores com uso de medidas resumo (média $\pm$ erro padrão), e comparados com uso de ANOVA com dois fatores.

Os dados dos marcadores imuno-histoquímicos foram descritos segundo o grupo (7, 75 e 210), calibre do vaso e coelhos (CT e IM-COLV), com uso de medidas resumo, e comparados com uso de ANOVA com três

^(II) SPSS Inc; Chicago, IL, EUA

fatores. Para os valores estatisticamente significativos, foram realizadas comparações múltiplas de Bonferroni, para verificar entre quais categorias os valores foram estatisticamente diferentes.

Para verificar a igualdade na análise da reatividade vascular nos coelhos CT e IM-COLV, foram aplicados testes t-Student.

A comparação da dosagem de 4-hidroxiprolina, imunofluorescência e expressão gênica dos colágenos I, III e V, entre os coelhos (CT e IM-COLV) e grupos (7, 75 e 210) avaliados, foi realizada com uso de ANOVA com dois fatores, sendo comparados os grupos e coelhos, se necessário, com uso de comparações múltiplas de Bonferroni.

Os testes foram realizados com significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Morfológica das Artérias Pulmonares Por Meio da Coloração de Hematoxilina e Eosina

No Grupo 7 dos coelhos IM-COLV, as artérias intrapulmonares apresentaram-se íntegras, com aspecto morfológico similar as dos coelhos CT, como foi demonstrado na Figura 5A e B. Por outro lado, nos Grupos 75 (Figura 5C e D) e 210 (Figura 5E e F) dos coelhos IM-COLV, foi observada a presença de um importante infiltrado celular intersticial com predomínio linfoplasmocitário, distribuído de forma irregular no parênquima pulmonar. Áreas de parênquima normal podiam ser vistas intercalando-se com o processo inflamatório, predominante nas imediações do eixo broncovascular dos bronquíolos terminais e respiratórios. O infiltrado celular apresentou-se distribuído ao redor das artérias intralobular e intra-acinar, levando à diminuição da luz vascular.

Figura 5 - Microscopia óptica das pequenas artérias pulmonares dos coelhos IM-COLV (B, D e F) e CT (A, C e E) dos Grupos 7, 75 e 210 (coloração HE, aumento 200x)

4.2 Análise da Área do Lúmen e Espessamento da Parede Vascular das Artérias Pulmonares

A análise morfológica dos vasos dos coelhos IM-COLV do Grupo 210 mostrava espessamento da parede e redução do lúmen. Dessa forma, os vasos foram submetidos à avaliação morfométrica. O mesmo procedimento deixou de ser feito nos Grupos 7 e 75 pelo fato deles não apresentarem evidências morfológicas de espessamento da parede ou estreitamento da luz vascular.

As artérias foram caracterizadas pela presença da camada média, composta por células musculares lisas, orientadas circularmente e delimitadas pelas membranas elásticas, interna e externa.

Inicialmente, as artérias pulmonares de ambos os grupos de coelhos, CT e IM-COLV, foram separadas de acordo com o seu diâmetro externo e comparadas para uniformizar a análise. Observamos que as artérias dos coelhos dos dois grupos mostraram diâmetros comparáveis para vasos de pequeno calibre ($11,73 \pm 3,39$ vs $10,35 \pm 3,40$ μm), médio calibre ($28,50 \pm 4,92$ vs $27,69 \pm 5,32$ μm) e grande calibre ($67,77 \pm 8,74$ vs $45,57 \pm 2,37$ μm).

Posteriormente, foi realizada a análise da espessura da camada média desses vasos onde notamos que não havia diferença entre os coelhos CT e os IM-COLV. Resultado semelhante ocorreu na análise da área luminal dos diferentes grupos (Tabela 1 e Gráficos 1 e 2).

Tabela 1 - Análise morfométrica das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV do Grupo 210*

Variável	Diâmetro do vaso	CT Grupo 210	IM-COLV Grupo 210
Espessura relativa da parede das artérias	Pequeno	0,78±0,03	0,73±0,03
	Médio	0,66±0,11	0,75±0,05
	Grande	0,70±0,11	0,69±0,03
Área interna relativa das artérias	Pequeno	0,62±0,05	0,54±0,04
	Médio	0,49±0,14	0,59±0,08
	Grande	0,53±0,16	0,48±0,04

*Os resultados são expressos em média±erro padrão
CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 1 - A espessura relativa da parede das artérias pulmonares de pequeno, médio e grande calibre não difere entre os coelhos CT e os IM-COLV no Grupo 210

Gráfico 2 - A área interna relativa das artérias pulmonares de pequeno, médio e grande calibre não difere nos coelhos CT e nos IM-COLV no Grupo 210

4.3 Alterações Ultraestruturais das Artérias Pulmonares

A análise da ultraestrutura dos vasos pulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV mostrou evidências de um dano vascular no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV, distribuído em diferentes intensidades, de acordo com os Grupos 7, 75 e 210. No Grupo 7, observou-se edema intracitoplasmático envolvendo as células endoteliais, destacando-se, porém, os núcleos com heterocromatina íntegra, a lâmina elástica interna contínua e a presença de fibroblastos não ativados (Figura 6 B, D e F). Já no Grupo 75, evidenciou-se apoptose franca do endotélio, caracterizada pelo acúmulo irregular de heterocromatina junto à membrana nuclear, ao lado de edema intracitoplasmático, irregularidade da lâmina elástica interna e ativação de miofibroblastos (Figura 7 B, D e F). No Grupo 210, foram detectadas as maiores alterações; percebeu-se que as células endoteliais estavam

aumentadas e seriamente degeneradas. Pequenos vacúolos podiam ser observados e os lúmens estavam reduzidos. A membrana elástica interna estava descontínua e apresentava espessura irregular. As células musculares lisas estavam hipertróficas e as organelas intracitoplasmáticas estavam abundantes (Figura 8 B, D e F).

Por outro lado, nas artérias pulmonares dos coelhos CT dos Grupos 7, 75 e 210, as células do endotélio vascular estavam planas e finas, a espessura da membrana elástica interna encontrava-se inalterada e as células musculares lisas tinham uma forma fusiforme normal. A estrutura de filamentos de actina mostrou um corpo denso e as manchas densas eram claras (Figuras 6, 7 e 8 A, C e E).

Figura 6 - Microscopia eletrônica das pequenas artérias pulmonares dos coelhos IM-COLV e CT do Grupo 7. No painel A, note a luz levemente reduzida, os núcleos e citoplasma das células endoteliais preservados. No painel A e C, observe a continuidade e uniformidade da lâmina elástica interna (seta pontilhada), apoiando-se sobre a camada de células musculares lisas intactas (C); neutrófilos por vezes aparecem no lúmen vascular (C e E; seta). Nos painéis B, D, F podem ser apreciado a luz vascular íntegra, envolvida pelas células endoteliais (seta), cujos núcleos acham-se preservados, exibindo heterocromatina uniformemente distribuída ao longo da membrana nuclear, porém com citoplasma denotando edema das organelas (F); identifica-se logo abaixo do endotélio, a lâmina elástica interna preservada (F; seta pontilhada), vindo a seguir a camada de células musculares lisas; note os miofibroblastos. Figuras representativas da ultraestrutura de vasos pulmonares corados com acetato de urânio e citrato de chumbo. Aumento original: B 2.550X, A, C e D 3.700X, E e F 6.200X. CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV; ENDO: célula endotelial; EL: membrana elástica; MUSC: camada muscular; NEU: neutrófilo; MIOF: miofibroblasto

Figura 7 - Microscopia eletrônica das pequenas artérias pulmonares dos coelhos CT e IM-COLV do Grupo 75. Nos painéis A, C, E, note a luz pérvea, os núcleos e citoplasma das células endoteliais preservados e a presença de fibroblastos inativos (seta pequena). No painel B pode ser apreciado a luz vascular preenchida por plasma e hemáceas, envolvida pelas células endoteliais (seta); note os fibroblastos ativados (miofibroblastos). Nos painéis D e F, os núcleos das células endoteliais acham-se em franca apoptose, exibindo heterocromatina irregularmente distribuída junto à membrana nuclear, sobressaindo-se o citoplasma com edema das organelas (F); abaixo do endotélio, a camada de células musculares lisas em desarranjo estrutural (F). Figuras representativas da ultraestrutura de vasos pulmonares corados com acetato de urânio e citrato de chumbo. Aumento original: A e B 1.850X, C 3.700X, D 6.200X, E 8.900X e F 12.500X. CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV; ENDO: célula endotelial; ALV: alvéolo; FIBRO: fibroblasto; MIOF: miofibroblasto; EL: membrana elástica; MUSC: camada muscular

Figura 8 - Microscopia eletrônica das pequenas artérias pulmonares dos coelhos CT e IM-COLV do Grupo 210. No painel A as células endoteliais estão preservadas exibindo heterocromatina homogeneamente distribuída junto à membrana nuclear (seta). Note a membrana elástica contínua e preservada (seta pontilhada). Nos painéis B e D as células endoteliais estão degeneradas (seta tracejada) e parecem estar destacadas da membrana elástica interna que encontra-se irregular e descontínua (seta pontilhada). Note migração de neutrófilo (seta). No painel C pode ser apreciado fibroblasto com sua forma fusiforme (seta). No painel E note a membrana elástica com sua espessura preservada e regular. No painel F os núcleos das células endoteliais acham-se em apoptose, exibindo cromatina condensada formando um circunscrito uniformemente denso. Figuras representativas da ultraestrutura de vasos pulmonares corados com acetato de urânio e citrato de chumbo. Aumento original: A, D e F 3.700X, B 2.550X, C 6.200X e E 12.500X. CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV; ENDO: célula endotelial; EL: membrana elástica; FIBRO: fibroblasto; NEU: neutrófilo; MIOF: miofibroblasto; MUSC: camada muscular.

4.4 Avaliação do Grau de Lesão Arterial Mediante a Porcentagem de Células Endoteliais CD31+

A avaliação do grau de lesão arterial foi realizada mediante a identificação e quantificação das células endoteliais. A identificação das células endoteliais foi realizada mediante a imunoexpressão da proteína CD31 (Figura 9). Esta glicoproteína de transmembrana é um constituinte da junção intercelular do endotélio e, portanto, um marcador específico do endotélio vascular.

O grau de lesão arterial, de acordo com a porcentagem de células endoteliais CD31+ dos grupos 7 e 75 foi similar entre os coelhos IM-COLV e CT (Tabelas 2 e 3, Gráficos 3 e 4). No Grupo 210, os coelhos IM-COLV apresentaram maior porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias de pequeno, médio e grande calibre, quando comparados com os coelhos CT (Tabela 4 e Gráfico 5), indicando um grau maior de reparação do endotélio após a lesão arterial.

Para observar se havia mudanças no grau de lesão arterial ao longo do tempo, realizou-se a comparação entre a porcentagem de células endoteliais CD31+ presentes nos Grupos 7, 75 e 210 (Tabela 5). Os coelhos CT mostraram uma redução significativa da porcentagem de células endoteliais CD31+ no Grupo 210 em relação ao Grupo 75, indicando um grau menor de lesão arterial a esse tempo. Por outro lado, os coelhos IM-COLV mostraram um aumento significativo da porcentagem de células endoteliais CD31+ no Grupo 210 em relação aos Grupos 7 e 75, indicando que a partir de 75 dias o grau de lesão arterial é maior (Gráfico 6).

Figura 9 - Imagens representativas de tecido pulmonar de coelhos CT e de IM-COLV dos Grupos 7, 75 e 210 com imunomarcção em células endoteliais de CD31, caspase-3, VEGF e ET-1. As setas indicam as células imunomarcadas. Aumento original 200X

Tabela 2 - Distribuição do grau de lesão arterial de acordo com a porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias pulmonares dos animais IM-COLV e CT no Grupo 7*

Artérias Pulmonares	Coelhos IM-COLV	Coelhos CT
Pequeno calibre	54,83 ± 3,71	61,32 ± 19,61
Médio calibre	63,00 ± 7,25	77,61 ± 18,92
Grande calibre	60,70 ± 9,37	67,51 ± 19,01

*Os resultados são expressos em média ± erro padrão (% de pontos positivos).
CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 3 - Porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias intrapulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV no Grupo 7

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana

Tabela 3 - Distribuição do grau de lesão arterial de acordo com a porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias pulmonares dos animais IM-COLV e CT no Grupo 75*

Artérias Pulmonares	Coelhos IM-COLV	Coelhos CT
Pequeno calibre	49,84 ± 7,91	69,41 ± 8,25
Médio calibre	63,34 ± 10,97	80,01 ± 4,64
Grande calibre	52,78 ± 7,84	71,74 ± 5,43

*Os resultados são expressos em média ± erro padrão (% de pontos positivos).
CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 4 - Porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias intrapulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV no Grupo 75

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana

Tabela 4 - Distribuição do grau de lesão arterial de acordo com a porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias pulmonares dos animais IM-COLV e CT no Grupo 210*

Artérias Pulmonares	Coelhos IM-COLV	Coelhos CT
Pequeno calibre	79,79 ± 6,87	33,33 ± 13,19
Médio calibre	87,50 ± 4,16	66,80 ± 19,19
Grande calibre	87,13 ± 4,65	29,41 ± 11,94

*Os resultados são expressos em média ± erro padrão (% de pontos positivos).
CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 5 - Porcentagem de células endoteliais CD31+ nas artérias intrapulmonares dos coelhos CT e dos IM-COLV no Grupo 210

A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,01$

Tabela 5 - Distribuição do grau de lesão arterial através da porcentagem de células endoteliais CD31+ presentes ao longo do tempo nos animais CT e IM-COLV*

Coelhos	Evolução Temporal (dias)	*DME	**EP	p
CT	7 - 75	-4,91	9,23	NS
	7 - 210	24,96	9,33	NS
	75 - 210	29,87	7,65	0,003
IM-COLV	7 - 75	4,19	8,43	NS
	7 - 210	-25,30	7,85	0,026
	75 - 210	-29,49	6,88	0,001

*DME: diferença média estimada; **EP: erro padrão.

CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 6 - Análise temporal comparativa do grau de lesão arterial através da porcentagem de células endoteliais CD31+ nos Grupos 7, 75 e 210 dos coelhos CT e IM-COLV

4.5 Avaliação do Grau de Lesão Arterial Mediante a Taxa de Apoptose Caspase-3+ das Células Endoteliais

O grau de lesão arterial foi também determinado pela identificação e quantificação da taxa de apoptose das células endoteliais. A imunoexpressão de caspase-3, a principal executora da apoptose na via das caspases (Figura 9), foi utilizada para identificar a apoptose das células endoteliais nas artérias pulmonares de pequeno, médio e grande calibre nos Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e IM-COLV.

O grau de lesão arterial, mediante a taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais do Grupo 7 foi similar entre os coelhos IM-COLV e CT (Tabela 6, Gráfico 7). Todavia, uma taxa significativamente maior de apoptose caspase-3+ das células endoteliais foi observada nas artérias pulmonares dos coelhos IM-COLV dos Grupos 75 e 210 (Tabelas 7 e 8, Gráficos 8 e 9).

Para observar se havia mudanças no grau de lesão arterial ao longo do tempo, de acordo com a taxa de apoptose caspase-3+, realizou-se a comparação entre Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e dos coelhos IM-COLV (Tabelas 9, Gráfico 10). Os coelhos CT mostraram uma redução significativa da taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais a partir dos 7 dias. Por outro lado, os coelhos IM-COLV mostraram um aumento significativo da taxa de apoptose caspase-3+ de células endoteliais entre os Grupos 7 e 210 dias.

Tabela 6 - Distribuição do grau de lesão arterial mediante a taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais dos animais IM-COLV e CT no Grupo 7*

Artérias Pulmonares	Coelhos IM-COLV	Coelhos CT
Pequeno calibre	59,46 ± 8,76	59,78 ± 6,54
Médio calibre	72,91 ± 9,13	83,18 ± 4,39
Grande calibre	80,82 ± 8,13	76,69 ± 2,62

*Os resultados são expressos em média ± erro padrão (% de pontos positivos).

CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 7 - Taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 7

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana.

Tabela 7 - Distribuição do grau de lesão arterial mediante a taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais dos animais IM-COLV e CT no Grupo 75*

Artérias Pulmonares	Coelhos IM-COLV	Coelhos CT
Pequeno calibre	79,76 ± 2,68	30,89 ± 5,01
Médio calibre	78,41 ± 4,41	47,55 ± 4,31
Grande calibre	83,76 ± 5,40	51,97 ± 8,58

*Os resultados são expressos em média ± erro padrão (% de pontos positivos).
CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 8 - Taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 75 *

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,01$

Tabela 8 - Distribuição do grau de lesão arterial mediante a taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais dos animais IM-COLV e CT no Grupo 210*

Artérias Pulmonares	Coelhos IM-COLV	Coelhos CT
Pequeno calibre	93,40 ± 1,73	6,33 ± 5,71
Médio calibre	90,66 ± 2,26	6,71 ± 4,25
Grande calibre	88,24 ± 3,19	4,92 ± 2,39

*Os resultados são expressos em média ± erro padrão (% de pontos positivos).
CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 9 - Taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 210

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,001$

Tabela 9 - Distribuição do grau de lesão arterial através da taxa de apoptose caspase-3+ das células endoteliais presentes ao longo do tempo nos animais CT e IM-COLV*

Coelhos	Evolução Temporal (dias)	*DME	**EP	p
CT	7 - 75	29,75	4,75	<0,001
	7 - 210	67,23	4,75	<0,001
	75 - 210	37,48	3,88	<0,001
IM-COLV	7 - 75	-9,58	4,34	NS
	7 - 210	-19,70	4,04	<0,001
	75 - 210	-10,13	3,54	0,079

*DME: diferença média estimada; **EP: erro padrão.

CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 10 Análise temporal comparativa do grau de lesão arterial através da porcentagem de apoptose caspase-3+ das células endoteliais nos Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e dos IM-COLV

4.6 Avaliação do Grau de Lesão Arterial Mediante os Índices de Atividade Endotelial VEGF+ e ET-1+

As imunoexpressões de VEGF, o principal mediador da angiogênese, e de ET-1, um peptídeo vasoativo que contribui para a regulação da resistência vascular (Figura 9), foram utilizadas para identificar o grau de lesão arterial mediante o índice de expressão de atividade das células endoteliais nas artérias pulmonares de pequeno, médio e grande calibre, dos Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e IM-COLV.

O grau de lesão arterial mediante os níveis de expressão de VEGF+ e ET-1+ nas células endoteliais foi significativamente maior nas artérias pulmonares dos coelhos IM-COLV, quando comparado com as artérias dos coelhos CT, nos três Grupos analisados (Tabelas 10 e 11, Gráficos 11, 12, 13, 14, 15 e 16).

Para observar se havia mudanças no grau de lesão arterial ao longo do tempo de acordo com o grau de atividade endotelial realizou-se a comparação entre coelhos IM-COLV dos Grupos 7, 75 e 210, e coelhos CT dos diferentes Grupos (Tabelas 12 e 13; Gráficos 17 e 18). Houve um aumento significativo da expressão de ambos marcadores de atividade endotelial ao longo do tempo nos coelhos imunizados. Interessante, nos coelhos CT, observou-se um aumento da expressão de VEGF entre 7 e 75 dias, declinando a seguir.

Tabela 10 - Distribuição do grau de lesão arterial mediante os índices de expressão do VEGF+ pelas células endoteliais dos animais IM-COLV e CT, nos Grupos 7, 75 e 210*

Artérias Pulmonares	Coelhos IM-COLV	Coelhos CT
Grupo 7		
Pequeno calibre	22,17 ± 8,32	1,85 ± 1,85
Médio calibre	28,53 ± 12,72	0,00 ± 0,00
Grande calibre	32,71 ± 12,57	1,07 ± 1,07
Grupo 75		
Pequeno calibre	37,66 ± 1,08	14,18 ± 1,64
Médio calibre	38,65 ± 3,27	19,42 ± 4,33
Grande calibre	45,25 ± 1,67	25,43 ± 3,37
Grupo 210		
Pequeno calibre	92,67 ± 1,58	5,50 ± 2,82
Médio calibre	90,87 ± 2,99	5,82 ± 3,06
Grande calibre	87,23 ± 2,07	9,81 ± 3,40

*Os resultados são expressos em média±erro padrão (% de pontos positivos).

CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 11 - Índice de atividade endotelial VEGF+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 7

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,001$.

Gráfico 12 - Índice de atividade endotelial VEGF+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 75

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,001$.

Gráfico 13 - Índice de atividade endotelial VEGF+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 210

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,001$.

Tabela 11 - Distribuição do grau de lesão arterial mediante os índices de expressão da ET-1+ pelas células endoteliais dos animais IM-COLV e CT nos Grupos 7, 75 e 210*

Artérias Pulmonares	Coelhos IM-COLV	Coelhos CT
Grupo 7		
Pequeno calibre	81,51 ± 6,37	33,80 ± 11,53
Médio calibre	68,39 ± 5,15	49,98 ± 6,67
Grande calibre	75,63 ± 8,41	32,72 ± 4,17
Grupo 75		
Pequeno calibre	76,57 ± 0,92	22,87 ± 3,28
Médio calibre	84,49 ± 6,61	24,93 ± 4,26
Grande calibre	87,59 ± 4,78	37,50 ± 2,65
Grupo 210		
Pequeno calibre	90,86 ± 3,11	12,48 ± 6,78
Médio calibre	86,79 ± 2,34	12,60 ± 2,71
Grande calibre	90,98 ± 2,51	8,12 ± 2,45

*Os resultados são expressos em média±erro padrão (% de pontos positivos).

CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 14 - Índice de atividade endotelial ET-1+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 7

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,001$.

Gráfico 15 - Índice de atividade endotelial ET-1+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 75

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,01$.

Gráfico 16 - Índice de atividade endotelial ET-1+ das artérias intrapulmonares dos coelhos CT e IM-COLV no Grupo 210

*A porcentagem de células positivas por artéria é representada como Boxplot para artérias de pequeno, médio e grande calibre. Cada caixa representa percentil 25 a 75. As linhas de fora da caixa representam percentil 10 e 90. As linhas de dentro do Box representam a mediana, $p < 0,001$.

Tabela 12 - Distribuição do grau de lesão arterial através do índice de atividade VEGF+ das células endoteliais presentes ao longo do tempo nos animais CT e IM-COLV*

Coelhos	Evolução Temporal (dias)	*DME	**EP	p
CT	7 - 75	-18,70	3,99	<0,001
	7 - 210	- 6,07	3,99	NS
	75 - 210	12,63	3,26	0,003
IM-COLV	7 - 75	-12,72	3,64	0,011
	7 - 210	-62,45	3,39	<0,001
	75 - 210	-49,74	2,97	<0,001

*DME: diferença média estimada; **EP: erro padrão.
CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 17 - Análise temporal comparativa do grau de lesão arterial através do índice de atividade endotelial VEGF+ nos Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e dos IM-COLV

Tabela 13 - Distribuição do grau de lesão arterial através do índice de atividade ET-1+ das células endoteliais presentes ao longo do tempo nos animais CT e IM-COLV*

Coelhos	Evolução Temporal (dias)	*DME	**EP	p
CT	7 - 75	10,40	4,55	NS
	7 - 210	27,77	4,35	<0,001
	75 - 210	17,37	3,99	0,001
IM-COLV	7 - 75	-7,71	4,21	NS
	7 - 210	-14,37	3,73	0,004
	75 - 210	-6,66	3,73	NS

*DME: diferença média estimada; **EP: erro padrão.

CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 18 - Análise temporal comparativa do grau de lesão arterial através do índice de atividade endotelial ET-1+ nos Grupos 7, 75 e 210, dos coelhos CT e dos IM-COLV

4.7 Teste de Vasoreatividade em Artéria Pulmonar

Para avaliar a reatividade vascular nos coelhos IM-COLV e nos CT, anéis da artéria pulmonar foram submetidos a experimentos em banho de órgão isolado para analisar a resposta a agonistas vasoativos.

Nos grupos 7 e 75 dias foi observada a mesma resposta de relaxamento máximo com a ação da acetilcolina entre os grupos CT e os IM-COLV.

No grupo 210, a resposta de relaxamento máximo com a ação da acetilcolina, após contração com noradrenalina, foi similar nos coelhos IM-COLV e nos CT (Gráfico 19). No entanto, a concentração de acetilcolina necessária para causar 50% do relaxamento máximo (EC_{50}) mostrou que os anéis de artéria pulmonar dos coelhos IM-COLV do Grupo 210 necessitaram

de uma dose maior de acetilcolina para obter o mesmo relaxamento que os coelhos CT ($15,82 \pm 2,8$ vs. $6,77 \pm 0,8$, $p=0,02$) (Gráfico 20).

Gráfico 19 - Relaxamento máximo dos anéis de artéria pulmonar dos coelhos CT e dos IM-COLV do Grupo 210

Gráfico 20 - EC_{50} dos anéis de artéria pulmonar dos coelhos CT e dos IM-COLV do Grupo 210

4.8 Dosagem Bioquímica do Colágeno no Tecido Pulmonar

Para dosagem bioquímica de colágeno, a 4-hidroxiprolina foi quantificada no tecido pulmonar e os resultados expressos em μg de 4-hidroxiprolina/mg de tecido liofilizado. O colágeno extraído do tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV apresentou maior quantidade de 4-hidroxiprolina do que o dos coelhos CT (Tabela 14). Essa diferença foi significativa nos três grupos analisados (7, 75 e 210 dias) (Gráfico 21).

Tabela 14 - Dosagem de 4-hidroxiprolina no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV e dos CT dos Grupos 7, 75 e 210*

Coelhos	Grupo 7	Grupo 75	Grupo 210
CT	5,04 $\pm$ 0,62	6,09 $\pm$ 0,59	8,19 $\pm$ 1,08
IM-COLV	6,13 $\pm$ 0,59	6,99 $\pm$ 0,69	9,75 $\pm$ 1,08

*Os resultados foram expresso em μg de 4-hidroxiprolina por mg de tecido pulmonar seco.
CT: controle; IM-COLV: imunizado com COLV

Gráfico 21 - Representação gráfica da quantidade de 4-hidroxiprolina no tecido pulmonar nos coelhos IM-COLV e nos CT nos Grupos 7, 75 e 210

*Os resultados foram expressos em µg de 4-hidroxiprolina por mg de tecido pulmonar seco. $p < 0,01$

4.9 Avaliação da expressão do RNAm dos colágenos I, III e V pela PCR em tempo real

A expressão gênica por meio do RNAm para os colágenos I, III e V nos grupos 7 e 75 não mostrou diferença estatística entre os coelhos IM-COLV e os CT (Gráficos 22, 23 e 24).

No grupo 210, houve maior expressão gênica do COLV nos coelhos IM-COLV em relação aos coelhos CT ($p=0,02$) (Gráfico 24); porém, não foi observada diferença estatística na expressão do RNAm do COLI e do COLIII entre os coelhos avaliados (Gráficos 22 e 23).

Gráfico 22 - Expressão de RNAm do COLI no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV e dos CT dos Grupos 7, 75 e 210

Gráfico 23 - Expressão de RNAm do COLIII no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV e dos CT dos Grupos 7, 75 e 210

Gráfico 24 - Expressão de RNAm do COLV no tecido pulmonar dos coelhos IM-COLV e dos CT dos Grupos 7, 75 e 210

* p < 0,001

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a vasculopatia pulmonar no modelo de ES induzido pelo COLV ocorre a partir de sete dias da primeira imunização, caracterizado-se por apoptose e ativação das células endoteliais. Esse é o primeiro trabalho a demonstrar a existência de alterações no endotélio pulmonar no modelo de ES induzido pelo COLV, reproduzindo, assim, condições semelhantes às observadas nos pacientes com ES^{28,53,58,60,71,137,142}.

O envolvimento vascular é um evento frequente da ES, e pode preceder outras manifestações da doença, como a fibrose². Dessa forma, a investigação de alterações precoces vasculares pode ser de grande importância para a elucidação do processo patogênico da doença. Porém, como os eventos iniciais da enfermidade humana geralmente não são acessíveis para estudo, a utilização de modelos animais se faz necessária. Nesse sentido, o modelo de ES induzido pelo COLV emerge como um modelo animal em potencial para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na vasculopatia pulmonar da ES.

A limitação dos modelos animais comumente utilizados para estudar a ES, como o camundongo Tsk-1 e o modelo induzido por bleomicina, é que eles não apresentam características típicas de vasculopatia^{31,80,83,85}. O modelo em galinhas UCD 200 não representa a doença humana, pois é um

modelo em aves e não em mamíferos, mesmo contemplando as principais características da ES, caracterizada por apoptose das células endoteliais em órgãos internos, infiltrado perivascular de células mononucleares e, por fim, fibrose^{31,80,85,95,143,144}. O modelo GVHD também reproduz as principais características da ES, no entanto, este modelo tem algumas limitações importantes, uma vez que requer habilidades técnicas sofisticadas para a realização do transplante e cuidados especiais para evitar infecções posteriores^{31,83,85,102,104}. Estudos recentes descrevem modelos utilizando camundongos transgênicos e knockouts, e alguns desenvolvem alterações vasculares características da ES^{83-85,105}.

O modelo transgênico Fra-2 tem sido considerado como um dos melhores modelos animais para estudar as manifestações da vasculopatia. Esses camundongos apresentam aumento da expressão do fator de transcrição, a proteína Fra-2, em diversos tecidos, e desenvolvem no pulmão fibrose extensa e vasculopatia proliferativa grave, porém, sem nenhuma evidência de apoptose endotelial. Por outro lado, na pele, foi detectada apoptose endotelial de microvasos, sem características de vasculopatia proliferativa, sugerindo que os efeitos dessa proteína Fra-2 na vasculopatia deve ser órgão dependente¹⁰⁶.

O modelo transgênico dependente de TGF β apresenta alterações fibróticas vasculares, como fibrose cardíaca extensa, aumento da espessura da camada adventícia do vaso, e também desenvolve alteração na reatividade vascular. Os camundongos Cre-ER TBR1^{CA}, sob ativação da sinalização do TGF β , desenvolvem estágio avançado de doença fibrótica e

espessamento da parede dos vasos do pulmão, do rim e das glândulas adrenais. Como esse modelo não desenvolve alterações histológicas vasculares que mimetizam a ES humana, é recomendado apenas para o estudo da fibrose e, em especial, para compreender o papel do TGF β na ativação do fibroblasto^{46,145}.

Por fim, os camundongos knockout para caveolina-1 (cav-1^{-/-}) apresentam fenótipo pulmonar grave, com espessamento dos septos alveolares, redução dos espaços alveolares e hiper celularidade intersticial. Além disso, os camundongos cav-1^{-/-} demonstram hipertensão pulmonar severa, com hipertrofia do ventrículo direito. Porém, o desenvolvimento de microangiopatia nesse modelo ainda não está esclarecido¹⁴⁶.

Em resumo, estes camundongos transgênicos e knockouts desenvolvem, no pulmão, manifestações tardias de vasculopatia e não apresentam as principais alterações que ocorrem nas células endoteliais. Além disso, nestes modelos, os animais foram manipulados geneticamente, devendo ser utilizados para estudar a participação de uma via específica, não expressando a doença por completo. Já o modelo COLV é induzido em animais saudáveis, que, ao contrário dos transgênicos, desenvolvem expressivas alterações de vasculopatia pulmonar precoce, envolvendo as células endoteliais, além de desenvolverem alteração na reatividade vascular endotélio dependente.

A vasculopatia é um processo que ocorre em todos os órgãos envolvidos na ES, porém neste trabalho temos como foco as alterações vasculares que ocorrem no pulmão, por este ser um órgão de extrema

importância para a doença, sendo atualmente considerado a principal causa de mortalidade nos casos de ES^{8,9}. Por fim, os resultados obtidos no presente estudo são de grande relevância e certamente contribuirão no melhor entendimento dos mecanismos patogênicos do modelo de ES induzido pelo COLV e da doença humana. Entre os achados destacam-se: a precocidade do início da lesão vascular que esteve presente após a primeira semana da imunização; a alteração da reatividade vascular ao estímulo com acetilcolina; e, finalmente, a maior expressão do RNAm do COLV no tecido pulmonar com alterações características de estágio inicial de remodelamento pulmonar.

Há cerca de dez anos, o modelo COLV, em coelhos, foi descrito e proposto como um modelo para estudar a ES humana¹¹⁰. Este modelo foi descoberto quando, ao se imunizar coelhos com COLV humano para obtenção de antissoro, os animais desenvolveram alterações histológicas compatíveis com a ES, caracterizadas por aumento no depósito de colágeno nos órgãos habitualmente envolvidos na doença humana, como pele, esôfago, coração, sinóvia e rim¹¹¹⁻¹¹⁶. Adicionalmente, foi detectada ativação do sistema imunológico com produção de autoanticorpos, como o fator antinúcleo e o anticorpo específico da ES, a antitopoisomerase I¹¹⁷.

No presente trabalho, estendemos essas observações, demonstrando um aumento significativo na densidade e na atividade das células endoteliais nos vasos intrapulmonares. Essas alterações se assemelham a neoangiogênese, descrita na fase inicial das manifestações pulmonares da ES humana^{71,72}. O aumento da densidade das células endoteliais observado no nosso modelo, apenas nos animais de 210 dias, pode representar uma

resposta ao estímulo de fatores de crescimento endotelial, como também se nota em fases precoces do envolvimento pulmonar da ES^{58,59,69,71,148}. O VEGF é um fator regulatório que está envolvido em diversos passos da angiogênese fisiológica e patológica, e está intensamente expresso na pele e no soro dos pacientes com ES⁵⁸⁻⁶⁰. Dessa forma, observamos já aos sete dias uma maior expressão desse fator de crescimento no endotélio vascular dos coelhos imunizados. Sugere-se, que o aumento crônico e descontrolado na regulação do VEGF pode ser a causa da morfologia alterada do vaso e dos distúrbios endoteliais que ocorrem na ES⁵⁸⁻⁶⁰. Os vasos que são induzidos pelo VEGF de forma descontrolada encontram-se dilatados e circundados por edema tecidual; alterações estas semelhantes às observadas na ultraestrutura das artérias pulmonares dos coelhos IM-COLV.

Aspecto surpreendente foi a identificação de dano e ativação endotelial, precocemente, aos sete dias da primeira imunização com COLV, demonstrados pelos achados de microscopia eletrônica e pela expressão dos imunomarcadores empregados. Estes dados ajudam a compreender o porquê da síntese aumentada de colágenos na pele de animais imunizados com COLV precocemente aos sete dias da imunização¹¹⁶. Admitimos que a ativação precoce das células endoteliais, tenha propiciado liberação de mediadores fibrogênicos como TGF beta e ET-1, levando à estimulação dos fibroblastos dérmicos. Como o processo de fibrinogênese foi muito precoce, acontecendo antes mesmo da ativação da resposta imunológica, sugerimos que o próprio COLV empregado na imunização foi a substância responsável pela ativação endotelial.

O aumento da expressão de ET-1 foi uma notável observação do presente modelo, observado, precocemente, aos sete dias, refletindo a existência de dano endotelial e os achados de lesão endotelial reportados na ES humana, caracterizados por redução na produção de vasodilatadores e aumento dos níveis de vasoconstritores^{149,150}. Este achado foi confirmado pela necessidade de uma quantidade maior de acetilcolina para obter o relaxamento da artéria pulmonar do modelo de ES induzido pelo COLV, provavelmente refletindo a maior expressão de ET-1, que estaria prejudicando o relaxamento adequado da artéria nos coelhos de 210 dias. Esses resultados podem representar alteração na complacência da artéria pulmonar, já reportado em pacientes com hipertensão arterial pulmonar, refletindo uma fase precoce da doença. Atualmente, a diminuição da complacência arterial nesse grupo de pacientes tem ganhado maior destaque, e estudos recentes mostraram uma correlação dessa alteração com sobrevida^{151,152}. Já o aumento da resistência vascular reflete um estágio mais avançado do comprometimento da artéria pulmonar, caracterizado pela progressão do processo de remodelamento vascular. Importante ressaltar que marcadores de fases mais tardias, como a desintegração estrutural da vasculatura, não foram observados no presente modelo⁷². Da mesma forma, a morfometria, uma técnica objetiva para avaliar a espessura e o diâmetro do vaso, mostrou não haver aumento da espessura da parede e estreitamento da luz, alterações tardias de vasculopatia proliferativa.

No presente trabalho, as alterações no tecido pulmonar descritas, tais como o infiltrado inflamatório e o aumento não-expressivo do colágeno,

também são características da fase inicial de remodelamento pulmonar. De fato, ao pesquisar a expressão gênica dos colágenos, notamos que apenas o COLV apresentou um aumento na regulação do RNAm, despontando como um marcador precoce de envolvimento pulmonar. Estudos recentes em biópsias pulmonares de pacientes com ES mostraram um aumento significativo do COLV no tecido pulmonar, que esteve associado com apoptose endotelial e alteração nas provas funcionais¹³⁷. Adicionalmente, trabalhos de nosso grupo têm demonstrado a relevância da expressão do COLV na camada íntima e na média da artéria pulmonar dos animais do modelo COLV. Ainda, foi encontrada uma produção aumentada de COLV por miofibroblastos isolados da parede da artéria pulmonar desses coelhos¹⁵³. Outros trabalhos realizados pelo grupo sustentam a hipótese da participação do COLV na patogênese da ES. Bezerra *et al.*¹¹⁴ demonstraram expressão aumentada de COLV, de uma maneira similar, tanto em pele do modelo experimental como em pacientes com ES. Além disso, o aumento de COLV formava densos feixes de espessura, ao contrário da pele normal, que expressa COLV em pequena quantidade, na forma de fibrilas muito finas. Dessa maneira, foi sugerido que o remodelamento alterado na ES poderia ser consequência de fibrilogênese anormal¹¹⁴. Outro estudo, realizado por Velosa *et al.*^{135,136}, também demonstrou imunomarcação anormal para o COLV em animais desse modelo experimental. De forma surpreendente, houve reversão desta alteração estrutural proteica nos animais que receberam indução de tolerância nasal com COLV, os quais voltaram a exibir padrão habitual de fibras finas de COLV, depositados na membrana

basal e na derme profunda. Este fato sugere que na ES, preferencialmente, ocorra um processo de remodelamento do colágeno, em detrimento da fibrose irreversível.

No presente modelo de ES induzido pelo COLV, demonstramos a apoptose das células endoteliais, um fenômeno marcante, que teve início após sete dias da primeira imunização, podendo refletir o evento primário na patogênese desse modelo, como sugerido na doença humana²⁸⁻³¹. Tais achados permitem levantar a hipótese de que a imunização com COLV pode promover apoptose endotelial, uma vez que esta proteína tem sido descrita como um promotor de apoptose em células de câncer^{154,155}. O processo de apoptose foi previamente descrito e associado aos modelos animais, e à patologia da autoimunidade da ES humana^{137,142,143,147}. A clivagem de certos autoantígenos durante a apoptose pode revelar epítomos imunocrípticos, que poderiam induzir autoanticorpos na resposta imune sistêmica de doenças autoimunes¹⁵⁶. O COLV pode ser um autoantígeno em potencial. Essa proteína é encontrada normalmente oculta, copolimerizada com os colágenos tipo I e tipo III^{126,129}. A exposição de um epítopo do COLV seria um candidato para desencadear o início da resposta imune nesse modelo animal.

O modelo de ES induzido pelo COLV desenvolve ativação do sistema imune, com produção de anticorpos, duas a três semanas após o estímulo antigênico¹¹⁷. Dessa forma, a precoce ativação endotelial observada nesse estudo e o aumento do depósito de colágeno na derme, descrito previamente, já aos sete dias¹¹⁶, não devem ser dependentes da

participação do sistema imune. No entanto, o depósito de colágeno nos diferentes órgãos e a apoptose do endotélio são progressivos e permanecem pelo menos 22 semanas após a última imunização, sugerindo que outro mecanismo, não dependente diretamente da imunização, deve estar envolvido.

Portanto, postulamos a existência de duas vias patogênicas no desenvolvimento da ES nesse modelo: a via direta, pela ação do COLV proveniente da imunização, e a via secundária, em que epítopos de COLV expostos estariam agindo como um neoantígeno, com ativação da resposta imune celular Th2 presente na ES³⁶. Acreditamos que, a imunização do coelho com COLV leve à formação de anticorpos anti COLV, originando imunecomplexos circulantes, que, quando depositados na superfície endotelial, ativam o sistema complemento, facilitando o influxo de células inflamatórias para o espaço matricial. Haveria liberação de metaloproteinases, que, ao destruir as fibras heterotípicas, liberariam fragmentos previamente ocultos de COLV (neoantígenos), iniciando um processo de autoimunidade. Postulamos que epítopos de COLV possam ser os antígenos que estimulam a resposta Th2, levando à fibrose e à autoimunidade. Importante salientar que, os neoantígenos, assim liberados, continuariam a estimular a síntese de autoanticorpos anti COLV, e o próprio COLV de formação endógena, poderia ativar continuamente as células endoteliais.

Esta teoria, baseada no modelo experimental, justifica o porquê de fatores exógenos, como vírus, substâncias tóxicas ou moléculas com tropismo para células endoteliais, poderem desencadear ES. Desde que o

estímulo fosse prolongado, haveria lesão do complexo endotélio-membrana basal, com exposição de fragmentos ocultos de COLV, que passariam tanto a ativar o endotélio, como a propiciar surgimento de anticorpos anti COLV, contribuindo na perpetuação da enfermidade. Consideramos relevante a participação de anticorpos anti COLV na manutenção da enfermidade, pois coelhos com ES, quando submetidos ao tratamento com tolerância ao COLV, apresentam reversão dos achados histopatológicos em pele e em pulmões^{135,136}.

As observações do presente estudo reforçam o papel do endotélio como o evento inicial na patogênese da ES. A evidência da disfunção vascular pulmonar, além da fibrose e autoimunidade descritas previamente, reforçam a importância do modelo ES induzido pelo COLV para o estudo dos mecanismos patogênicos da doença humana.

6 CONCLUSÕES

Concluimos que a vasculopatia pulmonar, no modelo de ES induzido pelo COLV, é um evento precoce e progressivo, caracterizada por apoptose das células endoteliais e ativação endotelial. Adicionalmente, mostramos alteração funcional dos anéis da artéria pulmonar que apresentaram uma menor sensibilidade vascular a ação da acetilcolina.

Confirmamos o remodelamento pulmonar pelo aumento do depósito de colágeno no tecido pulmonar, e o importante papel do COLV nesse remodelamento mostrando uma maior expressão gênica desse colágeno, precedendo o aumento colágeno tipo I e III como já demonstrado em outros estudos de pele.

Por fim, concluimos que o modelo de ES induzido pelo COLV apresenta envolvimento vascular além da fibrose e autoimunidade previamente descritos, o que torna esse modelo, o mais adequado e o mais importante instrumento para estudar a patogênese da ES e aplicação de protocolos terapêuticos.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação da CAPPesq **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 19/11/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0963/08**, intitulado: "**ESTUDO DA PATOGÊNESE DO ENVOLVIMENTO PULMONAR NO MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLERODERMIA INDUZIDO PELO COLÁGENO DO TIPO V**" 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: **Natalino Hajime Yoshinari**

Pesquisador (a) Executante: **Roberta Gonçalves**

CAPPesq, 24 de Novembro de 2008

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

Anexo B - Submissão do artigo

Arthritis & Rheumatism
Arthritis & Rheumatism	
Pulmonary vascular injury in the collagen V-induced systemic sclerosis model in rabbits	
Journal:	<i>Arthritis and Rheumatism</i>
Manuscript ID:	ar-11-1105
Wiley - Manuscript type:	Full Length
Keywords:	Animal Model, Systemic sclerosis, Collagen, Endothelium, Pulmonary
SCHOLARONE [™] Manuscripts	
Peer Review	
John Wiley & Sons	

8 REFERÊNCIAS

1. Chiffrot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J, Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 2008; 37:223-35.
2. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*. 2007; 117:557-67.
3. Goetz RH. Pathology of progressive systemic sclerosis (generalized scleroderma) with special reference to changes in the viscera. *Clin Proc*. 1945; 4:337-92.
4. LeRoy EC, Black CM, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, Rowell N, Wolheim F. Scleroderma; classification, subsets, and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988; 15:202-5.
5. Black CM, Stephens CO. Scleroderma-systemic sclerosis. In: Maddison PJ, Isenberg D, Woo P, Glass DN, editor. *Oxford Textbook of Rheumatology*. Oxford: Oxford University Press;1993. p. 771-89.
6. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association diagnostic and therapeutic criteria committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980; 23:581-90.

7. Black, C. M., Matucci-Cerinic, M. & Guillevin, L. Progress in systemic sclerosis: a 10-year perspective. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48: iii1-iii2.
8. Steen VD, Medsger TA Jr. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66:940-4.
9. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, Cozzi F, Carreira PE, Bancel DF, Allanore Y, Müller-Ladner U, Distler O, Iannone F, Pellerito R, Pileckyte M, Miniati I, Ananieva L, Gurman AB, Damjanov N, Mueller A, Valentini G, Riemekasten G, Tikly M, Hummers L, Henriques MJ, Caramaschi P, Scheja A, Rozman B, Ton E, Kumánovics G, Coleiro B, Feierl E, Szucs G, Von Mühlen CA, Riccieri V, Novak S, Chizzolini C, Kotulska A, Denton C, Coelho PC, Kötter I, Simsek I, de la Pena Lefebvre PG, Hachulla E, Seibold JR, Rednic S, Stork J, Morovic-Vergles J, Walker UA. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(10):1809-15.
10. Ramos-Casals M, Fonollosa-Pla V, Brito-Zerón P, Sisó-Almirall A; Medscape. Targeted therapy for systemic sclerosis: how close are we? *Nat Rev Rheumatol*. 2010; 6(5):269-78.
11. Pope, J. E. Connective tissue diseases: new evidence-based guidelines for treating SSc. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2009;5:300-2.

12. Clements PJ, Furst DE, Wong WK, Mayes M, White B, Wigley F, Weisman MH, Barr W, Moreland LW, Medsger TA Jr, Steen V, Martin RW, Collier D, Weinstein A, Lally E, Varga J, Weiner S, Andrews B, Abeles M, Seibold JR. High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis: analysis of a two-year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(6):1194-203.
13. Seibold JR, Korn JH, Simms R, Clements PJ, Moreland LW, Mayes MD, Furst DE, Rothfield N, Steen V, Weisman M, Collier D, Wigley FM, Merkel PA, Csuka ME, Hsu V, Rocco S, Erikson M, Hannigan J, Harkonen WS, Sanders ME. Recombinant human relaxin in the treatment of scleroderma. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 2000; 132(11):871-9.
14. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR, Baron M, Ellman M, Carette S, Smith CD, Chalmers IM, Hong P, O'Hanlon D, Kaminska E, Markland J, Sibley J, Catoggio L, Furst DE. A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(6):1351-8.

15. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, Arriola E, Silver R, Strange C, Bolster M, Seibold JR, Riley DJ, Hsu VM, Varga J, Schraufnagel DE, Theodore A, Simms R, Wise R, Wigley F, White B, Steen V, Read C, Mayes M, Parsley E, Mubarak K, Connolly MK, Golden J, Olman M, Fessler B, Rothfield N, Metersky M; Scleroderma Lung Study Research Group. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med*. 2006; 354(25):2655-66.
16. Khanna D, Clements PJ, Furst DE, Korn JH, Ellman M, Rothfield N, Wigley FM, Moreland LW, Silver R, Kim YH, Steen VD, Firestein GS, Kavanaugh AF, Weisman M, Mayes MD, Collier D, Csuka ME, Simms R, Merkel PA, Medsger TA Jr, Sanders ME, Maranian P, Seibold JR; Relaxin Investigators and the Scleroderma Clinical Trials Consortium. Recombinant human relaxin in the treatment of systemic sclerosis with diffuse cutaneous involvement: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(4):1102-11.
17. Riera R, Andrade LE, Souza AW, Kayser C, Yanagita ET, Trevisani VF. Lidocaine for systemic sclerosis: a double-blind randomized clinical trial. *Orphanet J Rare Dis*. 2011; 6:5.
18. Seibold JR, Denton CP, Furst DE, Guillevin L, Rubin LJ, Wells A, Matucci Cerinic M, Riemekasten G, Emery P, Chadha-Boreham H, Charef P, Roux S, Black CM. Randomized, prospective, placebo-controlled trial of bosentan in interstitial lung disease secondary to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(7):2101-8.

19. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:1359-62.
20. Arnett FC, Targoff IN, Mimori T, Goldstein R, Warner NB, Reveille JD. Interrelationship of major histocompatibility complex class II alleles and autoantibodies in four ethnic groups with various forms of myositis. *Arthritis Rheum.* 1996; 39:1507-18.
21. Ahmed SS, Tan FK. Identification of novel targets in scleroderma: update on population studies, cDNA arrays, SNP analysis, and mutations. *Curr Opin Rheumatol.* 2003; 15(6):766-71.
22. Agarwal SK, Reveille JD. The genetics of scleroderma (systemic sclerosis). *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22(2):133-8.
23. Sato H, Lagan AL, Alexopoulou C, Vassilakis DA, Ahmad T, Pantelidis P, Veeraraghavan S, Renzoni E, Denton C, Black C, Wells AU, du Bois RM, Welsh KI. The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere antibody positivity in SSc. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:558-64
24. Maître A, Hours M, Bonnetterre V, Arnaud J, Arslan MT, Carpentier P, Bergeret A, de Gaudemaris R. . Systemic sclerosis and occupational risk factors: role of solvents and cleaning products. *J Rheumatol.* 2004; 31:2395-2401.

25. Hamamdzic D, Kasman LM, LeRoy EC. The role of infectious agents in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14;694-98.
26. Jimenez SA, Arlett CM. Microchimerism and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2005; 17:86-90.
27. Herrick AL, Matucci Cerinic M. The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2001; 19:4-8.
28. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9 Suppl 2:S2.
29. Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48 Suppl 3:iii3-7.
30. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:509-37.
31. Sgong R. The vascular perspective of systemic sclerosis: of chickens, mice and men. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 20(3):169-76.
32. Jun JB, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003; 15(6):756-60.

33. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988; 332(6163):411-5.
34. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Xu SW, du Bois RM, Black CM. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol*. 1997; 115(3):831-41.
35. Waters CE, Shi-Wen X, Denton CP, Abraham DJ, Pearson JD. Signaling pathways regulating intercellular adhesion molecule 1 expression by endothelin 1: comparison with interleukin-1 β in normal and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(2):649-60.
36. Chizzolini C. T cells, B cells, and polarized immune response in the pathogenesis of fibrosis and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008; 20(6):707-12.
37. 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.
38. Prescott RJ, Jones CJP, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol*. 1992; 166:255-63.

39. 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(7):3649-59.
40. Giacomelli R, Cipriani P, Fulminis A, Barattelli G, Matucci-Cerinic M, D'Alò S, Cifone G, Toniatti G. Circulating gamma/delta T lymphocytes from systemic sclerosis (SSc) patients display a T helper (Th) 1 polarization. *Clin Exp Immunol.* 2001; 125(2):310-5.
41. Boin F, De Fanis U, Bartlett SJ, Wigley FM, Rosen A, Casolaro V. T cell polarization identifies distinct clinical phenotypes in scleroderma lung disease. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(4):1165-74.
42. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, Alms WJ, White B. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(6):1168-78.
43. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghoebar R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest.* 1992; 90:1479-85.
44. Varga J, Whitfield ML. Transforming growth factor-beta in systemic sclerosis (scleroderma). *Front Biosci (Schol Ed).* 2009; 1:226-35.
45. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(22):3056-62.

46. Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, Vanpelt CS, Geng YJ, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(1):334-44.
47. Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(7):1703-13.
48. Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, ten Dijke P, White B, Wigley FM, Goldschmidt-Clermont PJ. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99(6): 3908-13, 2002.
49. Trojanowska M. Noncanonical transforming growth factor beta signaling in scleroderma fibrosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009; 21(6):623-9.
50. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6:509-37.
51. 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):136-42.
52. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(4):255-73.

53. Kahaleh MB, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med*. 1979; 149:1326-35.
54. Claman HN, Giorno RC, Seibold JR. Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma. The myth of the “uninvolved skin”. *Arthritis Rheum*. 1991;34(12):1495-501.
55. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am*. 1996; 22(4):675-94.
56. Fleming JN, Schwartz SM. The pathology of scleroderma vascular disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008; 34(1):41-55;vi.
57. Nuttall A, Derrett-Smith E, Stratton R. Vascular disease in scleroderma. In: Abraham D, Clive H, Dashwood M, Coghlan G. *Advances in vascular medicine*. London: Springer-Verlag; 2010.
58. Distler O, Distler JH, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, Michel BA, Gay RE, Müller-Ladner U, Matucci-Cerinic M, Plate KH, Gassmann M, Gay S. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res*. 2004; 95(1):109-16.

-
59. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, Cipriani P, Conforti ML, Guiducci S, Gay RE, Michel BA, Brühlmann P, Müller-Ladner U, Gay S, Matucci-Cerinic M. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res.* 2002; 4(6):R11.
 60. Davies CA, Jeziorska M, Freemont AJ, Herrick AL. The differential expression of VEGF, VEGFR-2, and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis. *Hum Pathol.* 2006; 37(2):190-7.
 61. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9(6):669-76.
 62. Borzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzún M, Lisboa C. Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163:1648-53
 63. Kahaleh B. Vascular disease in scleroderma: mechanisms of vascular injury. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008; 34(1):57-71.
 64. Li Z, Jimenez SA. Protein kinase C δ and the c-Abl kinase are required for transforming growth factor- β induction of endothelial-mesenchymal transition in vitro. *Arthritis Rheum.* 2011 mar 18.
 65. Steen V. Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:97-9.

-
66. Schurawitzki H, Stiglbauer R, Graninger W, Herold C, Pölzleitner D, Burghuber OC, Tscholakoff D. Interstitial lung disease in progressive systemic sclerosis: high-resolution CT versus radiography. *Radiology*. 1990; 176(3):755-9.
 67. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, Haslam PL, Vassilakis DA, Black CM, du Bois RM. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165:1581-86.
 68. Homer RJ, Herzog EL. Recent advances in pulmonary fibrosis: implications for scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22(6):683-9.
 69. Castellino FV, Varga J. Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(4):213.
 70. Parra ER, Silvério da Costa LR, Ab'Saber A, Ribeiro de Carvalho CR, Kairalla RA, Fernezlían SM, Teixeira LR, Capelozzi VL. Nonhomogeneous density of CD34 and VCAM-1 alveolar capillaries in major types of idiopathic interstitial pneumonia. *Lung*. 2005; 183(5):363-73.
 71. Silver RM, Wells AU. Histopathology and bronchoalveolar lavage. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47(Suppl 5):v62-4.

-
72. Beon M, Harley RA, Wessels A, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Myofibroblast induction and microvascular alteration in scleroderma lung fibrosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2004; 22(6):733-42.
 73. Highland KB, Silver RM. New developments in scleroderma interstitial lung disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2005; 17(6):737-45.
 74. Hachulla E, Gressin V, Guillemin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, Kahan A, Cabane J, Francès C, Launay D, Mouthon L, Allanore Y, Tiev KP, Clerson P, de Groote P, Humbert M. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(12):3792-800.
 75. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, Black CM, Coghlan JG. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62(11):1088-93.
 76. Condliffe R, Kiely DG, Peacock AJ, Corris PA, Gibbs JS, Vrapai F, Das C, Elliot CA, Johnson M, DeSoyza J, Torpy C, Goldsmith K, Hodgkins D, Hughes RJ, Pepke-Zaba J, Coghlan JG. Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179(2):151-7.
 77. Steen V, Medsger TA Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum*. 2003; 48(2):516-22.

78. Le Pavec J, Humbert M, Mouthon L, Hassoun PM. Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181(12):1285-93.
79. Voelkel NF, R Sharon. *The pulmonary endothelium. Function in healthy and disease*. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd; 2009.
80. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol*. 2005; 26(11):587-95.
81. Clark SH. Animal models in scleroderma. *Curr Rheumatol Rep*. 2005; 7(2):150-5.
82. Lakos G, Takagawa S, Varga J. Animal models of scleroderma. *Methods Mol Med*. 2004; 102:377-93.
83. Wu M, Varga J. In perspective: murine models of scleroderma. *Curr Rheumatol Rep*. 2008; 10(3):173-82.
84. Artlett CM. Animal models of scleroderma: fresh insights. *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22(6):677-82.
85. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(10):2831-44.
86. Manetti M, Neumann E, Distler O, Muller-Ladner U. Animal Models of scleroderma: from cellular and molecular mechanisms to novel antifibrotic strategies. In: Abraham D, Clive H, Dashwood M, Coghlan G. *Advances in vascular medicine*. London: Springer-Verlag; 2010.

87. Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol.* 1976; 82(3):493-512.
88. Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, Moskow JJ, Manne J, Christner PJ, Buchberg AM, Jimenez SA. A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res.* 1996; 6(4):300-13.
89. Pablos JL, Everett ET, Norris JS. The tight skin mouse: an animal model of systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22:S81-5.
90. Baxter RM, Crowell TP, McCrann ME, Frew EM, Gardner H. Analysis of the tight skin (Tsk1/+) mouse as a model for testing antifibrotic agents. *Lab Invest.* 2005; 85:1199-209.
91. Saito S, Kasturi K, Bona C. Genetic and immunologic features associated with scleroderma-like syndrome of TSK mice. *Curr Rheumatol Rep.* 1999; 1:34-7.
92. Christner PJ, Peters J, Hawkins D, Siracusa LD, Jiménez SA. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum.* 1995; 38(12):1791-8.
93. Gentiletti J, McCloskey LJ, Artlett CM, Peters J, Jimenez SA, Christner PJ. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol.* 2005; 175(4):2418-26.

-
94. 94. Gershwin ME, Abplanalp H, Castles JJ, Ikeda RM, van der Water J, Eklund J, Haynes D. Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Exp Med*. 1981; 153(6):1640-59.
95. Nguyen VA, Sgonc R, Dietrich H, Wick G. Endothelial injury in internal organs of University of California at Davis line 200 (UCD 200) chickens, an animal model for systemic sclerosis (Scleroderma). *J Autoimmun*. 2000; 14(2):143-9.
96. Wick G, Andersson L, Hala K, Gershwin ME, Selmi C, Erf GF, Lamont SJ, Sgonc R. Avian models with spontaneous autoimmune diseases. *Adv Immunol*. 2006; 92:71-117.
97. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin I: local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol*. 1999; 112:456-62.
98. Yamamoto T. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res*. 2006; 297(8):333-44.
99. Ishikawa H, Takeda K, Okamoto A, Matsuo S, Isobe K. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J Invest Dermatol*. 2009; 129:1688-695.

100. Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin- induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol*. 2005; 14:81-95.
101. Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, Vuiblet V, Guillevin L, Mouthon L, Weill B, Batteux F. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induced systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol*. 2009; 182:5855-64.
102. Jaffee BD, Claman HN. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol*. 1983; 77:1-12.
103. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J Immunol*. 2002; 168(6):3088-98.
104. Ruzek MC, Jha S, Ledbetter S, Richards SM, Garman RD. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(4):1319-31.
105. Derrett-Smith EC, Denton CP, Sonnylal S. Animal models of scleroderma: lessons from transgenic and knockout mice. *Curr Opin Rheumatol*. 2009; 21(6):630-5.

106. Maurer B, Busch N, Jüngel A, Pileckyte M, Gay RE, Michel BA, Schett G, Gay S, Distler J, Distler O. Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation*. 2009; 120(23):2367-76.
107. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol*. 2010; 176(4):1983-98.
108. Denton CP, Lindahl GE, Khan K, Shiwen X, Ong VH, Gaspar NJ, Lazaridis K, Edwards DR, Leask A, Eastwood M, Leoni P, Renzoni EA, Bou Gharior G, Abraham DJ, Black CM. Activation of key profibrotic mechanisms in transgenic fibroblasts expressing kinase-deficient type II transforming growth factor- β receptor (TbRIIDk). *J Biol Chem*. 2005; 280:16053-65.
109. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*. 2001; 276(41):38121-38.
110. Teodoro WR: *Imunogenicidade ao colágeno do tipo V em coelhos. Um novo modelo experimental para o estudo da patogênese da vasculite de hipersensibilidade autoimune*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

111. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, et al. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract*. 2004; 200(10):681-91.
112. Yoshinari NH, Teodoro WR, Ogido LTI, Velosa APP, Prizon CC, Miron B, Bissoli JCC, Cuentas ERP; Capelozzi VL. Modelo experimental de doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) induzido por colágeno do tipo V. *Rev Bras Reumatol*. 2002; 42:295-305.
113. Teodoro WR, Miron BG, Tsuzuki L, Ogido I, Velosa AP, Abatepaulo F, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Synovial remodeling process induced by type V collagen immunization in rabbits. *Pathol Res Pract*. 2003; 199(9):605-12.
114. Bezerra MC, Teodoro WR, de Oliveira CC, Velosa AP, Ogido LT, Gauditano G, Parra ER, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen. *Arch Dermatol Res*. 2006; 298(2):51-7.
115. Ogido LT, Teodoro WR, Velosa AP, de Oliveira CC, Parra ER, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Abnormal collagen deposition in synovia after collagen type V immunization in rabbits. *Histol Histopathol*. 2008; 23(3):263-9.

116. de Oliveira CC, Velosa AP, Parra ER, Capelozzi VL, Teodoro WR, Yoshinari NH. Histomorphometric analysis of cutaneous remodeling in the early stage of the scleroderma model. *Clinics (São Paulo)*. 2009; 64(4):577-83.
117. 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(1):38-46.
118. Burgeson RE, El Adli FA, Kaitila II, Hollister DW. Fetal membrane collagens: identification of two new collagen alpha chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976; 73(8):2579-83.
119. Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagen: controlling elements in corneal morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1990; 580:143-60.
120. Birk DE, Fitch JM, Barbiarz JP, Linsenmayer YT. Collagetype I and collagen type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol*. 1998; 106: 999-1008.
121. 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; 116:417-26.

122. Adachi E, Hayashi T, Hashimoto PH. A comparison of the immunofluorescent localization of collagen types I, III and V with the distribution of reticular fibers on the same liver sections of the snow monkey (*Macaca fuscata*). *Cell Tissue Res.* 1991; 264:1-8.
123. Adachi E, Hayashi T. Comparison of axial banding patterns in fibrils of type V collagen and type I collagen. *Collagen Relat Res.* 1987;5:27-38.
124. Madri JA, Furthmayr H. Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum Pathol.* 1980; 11:353-66.
125. Madri JA, Furthmayr H. Isolation and tissue localization of type AB2 collagen from normal lung parenchyma. *Am J Pathol.* 1979; 94:323-32.
126. Adachi E, Hopkinson I, Hayashi T. Basement-membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *Int Rev Cytol.* 1997; 173:73-156.
127. Adachi E, Hayashi T. In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and Type I collagen: Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect. Tissue Res.* 1986; 14:257-66.
128. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.* 2001; 32:223-37.

-
129. Mayne R, Burgeson R. Structure and function of collagen types. In: Ulecham R. *Biology of extracellular matrix*, 20 ed. London: Academic Press; 1993. p. 1-37.
130. Hay ED. Matrix assembly. In: Hay ED. *Cell biology of extracellular matrix*. 20 ed. New York:Plenum. 1991. p. 221-49.
131. Marres DC, Heidler KM, Smith GN, Cummings OW, Harris ER, Foresman B, Wilkes DS. Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 23:62-70.
132. Haque MA, Mizoubichi T, Yasufuku T, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zheng Y, Woods K, Smith GN, Cummings OW, Heidler KM, Blum JS, Wilkes DS. Evidence for immune responses to a self antigen in lung transplantation: role of type V collagen specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol*. 2002; 169:1522-49.
133. Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnel PW, Smith GN Jr, Cummings OW, Foresman BH, Fujisawa T, Wilkes DS. Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 25:26-43.
134. Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, Smith GN Jr, Cummings OW, Fujisawa T, Wilkes DS. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat allografts by type V collagen induced oral tolerance. Transplantation. 2002; 73:500-5.

-
135. Velosa AP, Teodoro WR, de Oliveira CC, Dos Santos Filho A, Moutinho RF, Santos AG, Vendramini MB, Bueno C, Parra ER, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Collagen V nasal tolerance in experimental model of systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res*. 2007; 299(4):177-89.
136. Velosa AP, Teodoro WR, dos Anjos DM, Konno R, Oliveira CC, Katayama ML, Parra ER, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Collagen V-induced nasal tolerance downregulates pulmonary collagen mRNA gene and TGF-beta expression in experimental systemic sclerosis. *Respir Res*. 2010;11:1.
137. Parra ER, Aguiar AC Jr, Teodoro WR, de Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir J*. 2009; 3(3):135-42.
138. Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Ann Chem*. 1963; 35:1961-5.
139. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988; 96(5):379-94.
140. Norusis MJ. SPSS for Windows [18.0]. Chicago: SPSS Inc, 2002.

141. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-8.
142. Okazaki S, Ogawa F, Iwata Y, Hara T, Muroi E, Komura K, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S. Autoantibody against caspase-3, an executioner of apoptosis, in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int*. 2010; 30(7):871-8.
143. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest*. 1996; 98(3):785-92.
144. Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2010; 37(1):26-41.
145. Derrett-Smith EC, Dooley A, Khan K, Shi-wen X, Abraham D, Denton CP. Systemic vasculopathy with altered vasoreactivity in a transgenic mouse model of scleroderma. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(2):R69.
146. Wunderlich C, Schober K, Schmeisser A, Heerwagen C, Tausche AK, Steinbronn N, Brandt A, Kasper M, Schwencke C, Braun-Dullaeus RC, Strasser RH. The adverse cardiopulmonary phenotype of caveolin-1 deficient mice is mediated by a dysfunctional endothelium. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44(5):938-47.

-
147. Yamamoto T, Nishioka K. Possible role of apoptosis in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol*. 2004; 122(1):44-50.
148. Allanore Y, Borderie D, Lemaréchal H, Ekindjian OG, Kahan A. Nifedipine decreases sVCAM-1 concentrations and oxidative stress in systemic sclerosis but does not affect the concentrations of vascular endothelial growth factor or its soluble receptor 1. *Arthritis Res Ther*. 2004; 6(4):R309-14.
149. Cailes J, Winter S, du Bois RM, Evans TW. Defective endothelially mediated pulmonary vasodilation in systemic sclerosis. *Chest*. 1998; 114(1):178-84.
150. Abraham D, Dashwood M. Endothelin--role in vascular disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; Suppl 5:v23-4.
151. Lankhaar JW, Westerhof N, Faes TJ, Gan CT, Marques KM, Boonstra A, van den Berg FG, Postmus PE, Vonk-Noordegraaf A. Pulmonary vascular resistance and compliance stay inversely related during treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2008, 29(13):1688-95.
152. Souza R. Assessment of compliance in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2008; 29(13):1603-4.

-
153. Prizon CC. *Análise morfológica e padronização da cultura de miofibroblastos das artérias pulmonares em modelo experimental de doença difusa do tecido conjuntivo induzida pelo colágeno do tipo V* [monografia]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP, Fundação do Desenvolvimento Administrativo, 2003.
154. 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.
155. Souza P, Rizzardi F, Noletto G, Atanzio M, Bianchi O, Parra ER, Teodoro WR, Carrasco S, Velosa AP, Fernezlian S, Ab'saber AM, Antonângelo L, Takagaki T, Schainberg CG, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Refractory remodeling of the microenvironment by abnormal type V collagen, apoptosis, and immune response in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol.* 2010; 41(2):239-48.
156. Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med.* 1996; 184(2):765-70.