

*Olga Maria de Silvério Carvalho*

*Efeito modulador da vitamina A no  
período pré-natal do pulmão do  
murganho. Estudo comparativo  
entre géneros*

*Coímbra 2011*

Dissertação de Doutoramento  
apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de Coimbra

A Faculdade de Medicina de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação.

(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art.108º§ único).

A presente tese de Doutoramento teve o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia (Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/35450/2007).

AOS MEUS PAIS

AO MEU IRMÃO E SOBRINHAS

AOS MEUS AMIGOS

## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Gonçalves gostaria de agradecer a honra de aceitar a orientação desta dissertação, bem como a transmissão dos seus preciosos conhecimentos científicos e constante incentivo na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Vasco Bairos, gostaria de agradecer o amável acolhimento no Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina e todo o seu apoio científico.

À Senhora Doutora Paula Rodrigues da Universidade de Alto Douro e Trás-os-Montes e Alto Douro, agradeço a co-orientação da tese e a sua colaboração na elaboração do modelo experimental.

À Senhora Doutora Ana Honório, quero agradecer a sua prestimosa e indispensável participação em todas as análises realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

À Senhora Doutora Maria da Graça Morais, agradeço a permanente disponibilidade e sua colaboração na realização das técnicas de Imunocitoquímica

À Senhora D<sup>a</sup> Arlete Joaquim gostaria de agradecer a sua permanente disponibilidade e toda a ajuda dada na manutenção e tratamento dos animais de experimentação.

Aos meus amigos, em que distingo a Professora Doutora Maria Francelina Lopes e Professor Doutor Fernando Guerra, quero manifestar o meu reconhecimento pelo estímulo e apoio que me proporcionaram.

## Indice

1. Introdução	3-70
2. Material e métodos	73-90
3. Resultados	93-133
4. Discussão	137-153
5. Conclusão	157-159
6. Resumo/summary	163-166
7. Apêndice técnico	169-177
8. Bibliografia	181-203

A vertical strip of a microscopic image showing lung tissue, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image displays the intricate branching structure of the alveoli and the surrounding connective tissue.

## Introdução

- 1.1. Desenvolvimento pulmonar
- 1.2. Regulação da morfogénese pulmonar
- 1.3. Estrutura da parede alveolar
- 1.4. Elastogénese pulmonar
- 1.5. Vitamina A

## 1.1. Desenvolvimento pulmonar

Na maior parte dos mamíferos, o desenvolvimento pulmonar ocorre durante o período pré-natal até ao pós-natal e compreende cinco fases, designadas por embrionária, pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar (Wert, 2004; Joshi, 2007).

O pulmão começa como um divertículo na parede ventral do intestino anterior e prossegue o seu desenvolvimento formando as porções condutoras, ou árvore brônquica, através de um rápido crescimento e repetida ramificação do divertículo respiratório primitivo, até que todos os ramos da árvore brônquica estejam formados. Depois ocorre o crescimento, expansão, sendo na fase alveolar que se formam e maturam os milhões de alvéolos do pulmão (fig. 1).

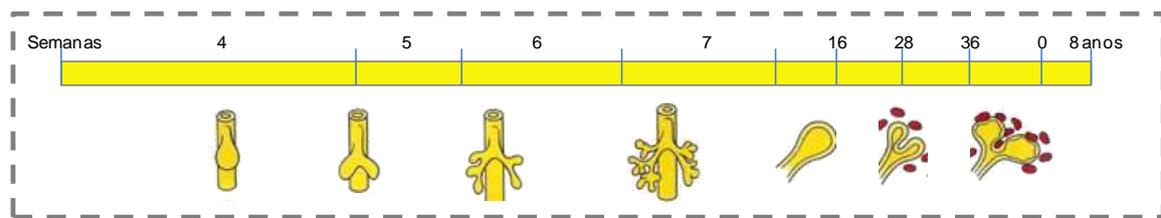


Figura 1. Desenvolvimento pulmonar (adaptado de Schoenwolf, 2009)

Apesar de às 35 semanas de gestação já se encontrarem alvéolos definitivos, será nos primeiros 6 meses de vida pós-natal que se formam mais de 85 a 90% de todos os alvéolos. A partir desta idade os alvéolos continuam a formar-se, mas a um ritmo mais lento até aos 1,5-2 anos de idade, altura em que o crescimento do pulmão acompanha proporcionalmente o crescimento do corpo. Até aos 18 anos de idade, a área de trocas gasosas e a capacidade de difusão aumentam linearmente com o peso corporal (Wert, 2004; Joshi, 2007).

Durante a **fase embrionária** (3<sup>a</sup>-7<sup>a</sup> semanas após a concepção (p.c.) surge o primórdio pulmonar e no final desta fase há um esboço da árvore pulmonar, sendo visível o brotamento direito e esquerdo, bem como alguns túbulos brônquicos pouco ramificados, havendo também a completa separação entre a traqueia e o esófago (Moore, 1998; Gilbert, 2003; Wert, 2004; Schoenwolf, 2009).

A **fase pseudoglandular** (7<sup>a</sup>-17<sup>a</sup> semanas p.c.) caracteriza-se pela sucessiva ramificação dicotómica, sendo possível que durante esta fase se

estabeleça quase toda a porção condutora (Joshi, 2007). Neste período há ainda a diferenciação do epitélio que reveste as zonas que conduzem o ar (Joshi, 2007). Os túbulos brônquicos inicialmente são revestidos por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico, e à medida que prossegue a ramificação, passa a epitélio cilíndrico simples nas passagens proximais e a epitélio cúbico simples nos túbulos acinares distais e botões (Wert, 2004).

Na **fase canalicular** (17<sup>a</sup>-27<sup>a</sup> semanas p.c.) os conjuntos de túbulos acinares e botões vão crescer, subdividindo-se e alongando-se, à custa do mesênquima envolvente, sofrendo ainda diferenciação celular (Wert, 2004; Schoenwolf, 2009). Nesta fase de remodelação das porções distais há um aumento da rede capilar, condensação e redução da espessura do mesênquima entre os ductos terminais e início da diferenciação do epitélio distal, sendo já possível observar células alveolares tipo I e II nas regiões distais (Wert, 2004). As células alveolares tipo II, que à medida que se diferenciam começam a perder glicogénio intracelular e adquirem os corpos multilamelares (Chi, 1985), iniciam a excreção de surfactante (Khor, 1994). O crescimento periférico é acompanhado pelo crescimento e desenvolvimento dos capilares intra-acinares, que se dispõem em redor dos espaços aéreos, estabelecendo contacto com o epitélio adjacente e formando a membrana alvéolo-capilar primitiva (Wert, 2004).

Na **fase sacular** (28<sup>a</sup>-36<sup>a</sup> semanas p.c.) os conjuntos de túbulos acinares e botões terminais começam a dilatar e expandir-se até sáculos alveolares e ductos transitórios, havendo uma acentuada redução ou condensação do tecido mesenquimatoso envolvente (Wert, 2004). As células alveolares tipo II continuam a sua maturação, reduzindo o teor de glicogénio intracelular e aumentando o número e tamanho dos corpos lamelares (Wert, 2004) e as células alveolares tipo I continuam a sua diferenciação, adelgaçando-se cada vez mais, o que permite aumentar a área de superfície no pulmão distal (Joshi, 2007). Os capilares associam-se mais intimamente com as células tipo I, diminuindo assim a distância de difusão entre os futuros espaços aéreos e os capilares (Fig.2b).

A **fase alveolar** (36<sup>a</sup> semana até 2 anos pós-natal) está caracterizada pelo desenvolvimento dos septos alveolares secundários, que dividem os ductos terminais e sáculos em verdadeiros ductos alveolares e alvéolos, processo que aumenta extraordinariamente a superfície pulmonar de trocas gasosas (Wert, 2004). Há redução do tecido conjuntivo intersticial e a remodelação do leito capilar, ocorre por fusão da rede capilar de dois septos adjacentes (Wert, 2004).

## Desenvolvimento pulmonar do murganho

O desenvolvimento do pulmão varia de espécie para espécie, mas os roedores, em especial no rato e no murganho, apresentam as mesmas cinco fases existentes no homem, no entanto com menor duração e pequenas diferenças ao nível estrutural e histológico, não deixando de ser considerados excelentes modelos experimentais para o estudo pulmonar (Fig.2).

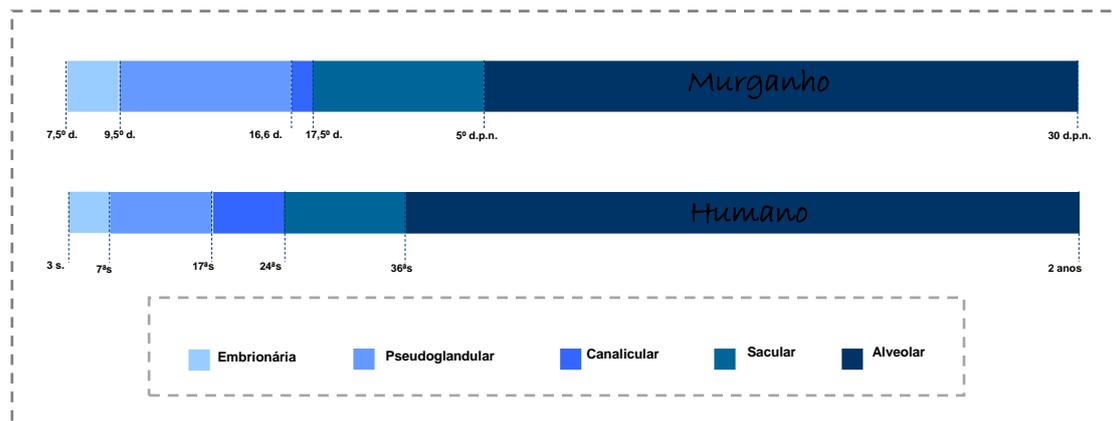


Figura 2. Comparação entre as fases do desenvolvimento pulmonar humana e no murganho (realizado com base em Ten Have-Opbroek, 1991 e Wert, 2004).

Os murganhos - *Mus musculus*- são animais nocturnos, territoriais, que gostam de fazer ninhos, um pouco agressivos e que em cativeiro estabelecem relações hierárquicas, existindo um macho predominante por gaiola. O período de reprodução inicia-se por volta do 50<sup>o</sup> dia de vida, em ambos os sexos, embora as fêmeas possam ter o seu primeiro cio a partir do 25<sup>o</sup> dia de vida. As fêmeas são poliestras, procriam o ano inteiro e têm ovulação espontânea. A duração do ciclo é de 4-5 dias e o estro dura cerca de 12 horas, ocorrendo durante a noite.

A duração média da gestação varia entre 19 e 21 dias e o número médio de crias pode variar entre 6 e 12 dependendo da estirpe. Ao nascer as crias podem pesar entre 0.5 a 1.5 g, não apresentando pêlo e tendo os olhos e as orelhas fechados.

Como não faremos uma descrição do desenvolvimento embrionário do murganho e apenas descreveremos o desenvolvimento pulmonar, apresentamos um esquema que ilustra o aspecto do embrião/feto durante o desenvolvimento intra-uterino (fig. 3).

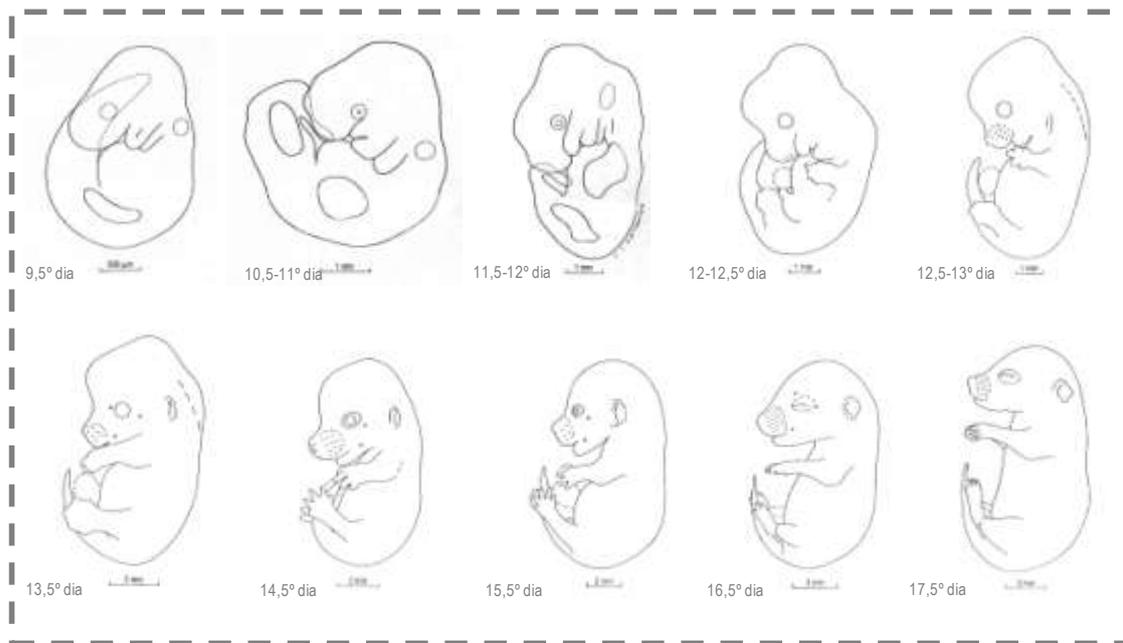


Figura 3. Aspecto geral do desenvolvimento do embrião/feto de murganho (adaptado de Kaufman, 1992).

O intestino anterior primitivo forma-se por volta do dia de gestação E7,5, quando uma camada de células endodérmicas, localizada na superfície externa do embrião, sofre especificações anterior-posterior (A-P) e expressa genes específicos do A-P (Cardoso, 2001).

Entre os dias E7,5 e E8,5, movimentos morfogênicos complexos da endoderme e o pregueamento cefalo-caudal e lateral do embrião levam à invaginação e fecho desta camada, formando-se assim o intestino, que dará origem aos pulmões, fígado, pâncreas e estômago (Cardoso, 2001).

As células da endoderme revestem o tubo e as células da mesoderme migram e condensam-se em redor da endoderme, formando a mesoderme esplâncnica, que se diferencia na camada muscular da parede do intestino e a mesoderme somática, que vai formar a parede anterior da cavidade torácica e abdominal do embrião (Cardoso, 2001).

O primórdio do pulmão do murganho irrompe ao dia de gestação E9,5, com a evaginação da endoderme do intestino anterior e da mesoderme esplâncnica envolvente. A partir deste primórdio, desenvolve-se a traqueia, numa região proximal ao local de brotamento do primórdio, e dois botões pulmonares, botões esses que vão dar origem a um sistema primordial de estruturas tubulares, que mais tarde formarão toda a estrutura pulmonar (Ten Have-Opbroek, 1981; Ten Have-Opbroek, 1991).

Na fase pseudoglandular, que decorre entre os dias E9,5 e E16,5, há a formação da árvore brônquica primordial, que depois se irá diferenciar no sistema brônquico e respiratório. Ocorre um rápido crescimento e ramificação da árvore brônquica, e o pulmão apresenta um aspecto glandular, com túbulos epiteliais separados por mesênquima muito espesso (Ten Have-Opbroek, 1981; Ten Have-Opbroek, 1991).

No dia de gestação E14,2, o sistema primordial diferencia-se na parte proximal, que dá origem à porção condutora pulmonar, e na parte distal, a partir da qual se desenvolverá a porção respiratória do pulmão (Ten Have-Opbroek, 1981). A região proximal está formada por túbulos brônquicos, revestidos por um epitélio cilíndrico simples, e a região distal por túbulos acinares, revestidos por um epitélio cúbico simples (Ten Have-Opbroek, 1981).

Por volta do dia de gestação E15, ocorre a transição abrupta entre o epitélio cilíndrico do sistema brônquico e o epitélio cúbico dos ácinos pulmonares (Ten Have-Opbroek, 1991).

A árvore brônquica cresce e ramifica-se por brotamento terminal e lateral, o que faz com que aconteça um aumento do número de gerações dos túbulos brônquicos e acinares. No entanto, o sistema respiratório não mantém a sua aparência tubular nas fases mais avançadas do desenvolvimento, passando de túbulos acinares para estruturas com forma de ducto, saco ou bolsa terminal (Ten Have-Opbroek, 1981; Ten Have-Opbroek, 1991).

No final da fase pseudoglandular os brônquios e bronquíolos dos murganhos estão formados e começa a diferenciação epitelial (Perl, 1999).

Na fase canalicular, que ocorre do dia E16,5 ao E17,5, mantém-se a ramificação das passagens aéreas e o mesênquima fica mais fino, o que permite uma maior aproximação entre os túbulos epiteliais e os vasos sanguíneos (Ten Have-Opbroek, 1981; Ten Have-Opbroek, 1991).

Na fase sacular, entre o dia de gestação E17,5 e o 5º dia de vida pós-natal (P5), os botões terminais expandem-se progressivamente formando estruturas semelhantes a sacos - os sáculos pré-alveolares -, caracterizados por um mesênquima muito mais fino e em íntima aposição aos capilares, e que se expandem durante esta fase (Ten Have-Opbroek, 1981; Ten Have-Opbroek, 1991).

Na fase alveolar, que decorre entre o dia de vida pós-natal P5 e P30, surgem os septos secundários, que vão dar origem aos alvéolos maduros. Os sáculos pré-alveolares são subdivididos em alvéolos por septação secundária, um

processo iniciado ao nascimento e que continua na vida pós-natal (Perl, 1999; Ten Have-Opbroek, 1991).

## **1.2. Regulação da morfogénese pulmonar**

O termo morfogénese refere-se a uma série de eventos moleculares e celulares que ocorrem durante o desenvolvimento dos tecidos e órgãos. No caso do pulmão, representa o processo que permite a formação das passagens aéreas e dos alvéolos, o que, dependendo da espécie, pode compreender a vida pré e pós-natal.

O pulmão deriva do intestino anterior primitivo que se forma logo após a fase de gastrulação, quando em resultado do pregueamento lateral do embrião, a endoderme é incorporada no corpo do embrião formando o tubo digestivo primitivo. O divertículo pulmonar surge no intestino anterior primitivo por volta da quarta semana de gestação, sendo revestido internamente pela endoderme, que dará origem às células do epitélio respiratório e recoberto por mesoderme esplâncnica, que dará origem ao mesênquima que depois se diferencia em cartilagem, vasos sanguíneos, músculo liso e tecido conjuntivo. A árvore respiratória forma-se por sucessivos brotamentos e ramificações, havendo dicotomia dos ductos e formando-se os brônquios primários, seguida de sucessivas ordens de ramificação, prosseguindo com a completa diferenciação do sistema respiratório.

Cada fase do desenvolvimento pulmonar é resultado de vários eventos bem complexos e altamente regulados por factores físicos, ambientais, hormonais e genéticos. Dos inúmeros factores que regulam cada fase do desenvolvimento pulmonar, serão sucintamente apresentados os mais importantes (Kumar, 2005; Cardoso, 2006; Maeda, 2007).

### **Fase embrionária - morfogénese do intestino**

Entre os sinais essenciais na morfogénese do intestino, encontramos o factor hepatocitário nuclear  $3\beta$  (HNF- $3\beta$ ) ou FOXa2, e os factores de transcrição GATA6, GATA4, Gli2 e Gli3, que regulam a formação da endoderme do intestino anterior e conseqüentemente todos os seus derivados, nos quais se incluem os pulmões (Morrisey, 1998; Cardoso, 2001; Cardoso, 2006; Cai, 2008).

O **HNF- $3\beta$**  é um membro da família de factores de transcrição nuclear denominado de “forkhead box”. Estas proteínas nucleares estão envolvidas no

destino celular, citodiferenciação e transcrição de genes em diversos órgãos e nos derivados da endoderme do intestino anterior (Costa, 2001).

O HNF-3 $\beta$ , induz as células progenitoras da endoderme a formar o intestino anterior primitivo, e caso este não se forme, todas as estruturas que dele derivam, também não se vão formar, como será o exemplo do pulmão (Cardoso, 2001; Cardoso, 2006). Os murganhos com mutação homozigótica Hnf-3 $\beta$  (-/-), morrem entre o dia de gestação E7 e E9,5, apresentando múltiplos defeitos, entre os quais, a falha na incorporação da endoderme no corpo do embrião e o fecho do intestino (Cardoso, 2001).

Ao que sabemos este factor regula o destino específico das células da endoderme do intestino anterior e coopera com outro factor de transcrição, o TTF-1 (factor de transcrição da tiróide), para determinar a linhagem das células epiteliais.

O HNF-3 $\beta$  foi detectado no epitélio do pulmão em desenvolvimento, e mantém a sua expressão no epitélio brônquico e alveolar do pulmão completamente diferenciado (Wert, 2004).

No início da fase embrionária o factor de transcrição **GATA6** é essencial para a formação da endoderme primitiva e para a diferenciação da endoderme parietal e visceral (Cai, 2008). Também induz a diferenciação da endoderme do intestino anterior primitivo nas diferentes linhagens celulares respiratórias, através da interacção com TTF-1 e HNF-3 $\beta$  (Costa, 2001).

A ausência do GATA6 durante a fase embrionária é letal, isto é, a deleção homozigótica Gata6 -/-, provoca a morte dos murganhos, entre o dia de gestação E6,5 e E7,5, muito antes do início da formação do pulmão (Morrisey, 1998). De facto tem um papel crítico na diferenciação da endoderme, sendo necessário para a sobrevivência do embrião e para o estabelecimento do epitélio brônquico (Morrisey, 1998). Também é requerido para manter o nível de expressão do factor GATA4 e para regular a expressão do HNF4 (Morrisey, 1998).

Numa fase mais avançada, o GATA6 também actua na ramificação secundária e na diferenciação epitelial (Keijzer, 2001).

O factor **GATA4** parece estar envolvido no desenvolvimento pulmonar, uma vez que a deleção deste gene causa a morte dos murganhos, entre o dia de gestação E7 e E9,5, sendo possível observar alterações na dobragem do embrião e na morfogénese da endoderme (Cardoso, 2001).

Os factores de transcrição **Gli1**, **Gli2** e **Gli3** estão expressos na mesoderme do intestino anterior e modelam a expressão de outros genes que intervêm no desenvolvimento pulmonar. O Gli1 parece não interferir no desenvolvimento do intestino anterior e do pulmão, uma vez que os animais com mutação homozigótica para este factor, não apresentam qualquer tipo de anomalia pulmonar (Park, 2000). Pelo contrário, os factores Gli2 e Gli3 mostraram ser importantes para o desenvolvimento do intestino anterior. A ausência do Gli2 causa estenose esofágica e traqueal, hipoplasia pulmonar e defeitos na lobulação pulmonar (fusão dos 4 lobos num só), e a inactivação genética de ambos (Gli2 e Gli3), resulta na completa agenesia pulmonar e agenesia da traqueia e esófago (Motoyama, 1998).

### **Fase embrionária - início do botão pulmonar**

No homem os primeiros botões surgem por volta da quarta semana de gestação, enquanto no murganho e rato, estes aparecem nos dias de gestação E9,5 e E11,5 respectivamente. Os botões formados de cada lado ventro-lateral do intestino anterior, invadem a mesoderme adjacente e crescem caudal e ventralmente, encontrando-se na linha média para formar o pulmão primordial.

Apesar de ainda não serem conhecidos todos os mecanismos que controlam os eventos iniciais do desenvolvimento pulmonar, existem alguns reguladores com acção reconhecida, como sejam os SHH, Gli2, Gli3, FGF-10, BMP4 e vitamina A (Cardoso, 2000; Cardoso, 2006).

A **glicoproteína SHH**, pertence a uma família de factores de secreção que inicia uma cascata de sinais, necessários para diversos processos embriológicos. Nesta fase do desenvolvimento, SHH é essencial para a formação do septo traqueoesofágico e portanto, crucial para a separação entre os aparelhos digestivo e respiratório (Litingtung, 1998). Este facto foi comprovado em murganhos com mutação homozigótica *Shh*  $-/-$ , onde não ocorre separação entre esófago e traqueia, formando-se um tubo traqueoesofágico fundido (Litingtung, 1998). Estes animais ainda apresentam graves alterações na ramificação da árvore brônquica, desenvolvendo pulmões rudimentares, o que evidencia o papel fundamental da SHH na ramificação pulmonar (Litingtung, 1998).

Esta proteína está expressa na endoderme do intestino anterior e no epitélio pulmonar, onde induz proliferação pulmonar, sendo também expressa na notocorda, placa neural e cérebro (Bellusci, 1997a). A SHH liga-se aos seus receptores PTCH1 ("patched 1") e PTCH2 ("patched 2"), que são expressos na

mesoderme e endoderme do pulmão, e liberta uma outra proteína transmembranar – a “smoothened” (SMO), que é translocada para o núcleo onde activa os genes Gli2 e Gli3 (Bellusci, 1997a).

No murganho, os factores de **transcrição Gli2 e Gli3** têm sido implicados na tradução do sinal da glicoproteína SHH (Motoyama, 1998; Park, 2000). Estes factores de transcrição estão expressos no mesênquima pulmonar e a sua expressão é induzida pela proteína SHH (Motoyama, 1998). Por sua vez estes factores modelam a expressão de outros genes, nomeadamente a do factor de crescimento FGF-10.

Os murganhos com mutação homozigótica Gli2 (Gli2 -/-), morrem logo à nascença com graves defeitos ósseos e neurais, e defeitos nos órgãos com origem no intestino anterior, incluindo estenose do esófago (sem musculo liso e lúmen pequeno), estenose da traqueia (anéis mais pequenos) e vários defeitos pulmonares (Motoyama, 1998). O pulmão apresenta uma redução significativa do seu tamanho, apenas um lobo no lado direito, em vez dos quatro habituais, mesênquima mais espesso e pequenos sacos aéreos. Pensa-se que a hipoplasia pulmonar observada nos murganhos Gli2 -/-, se deve a um decréscimo da proliferação celular (Motoyama, 1998). Nos animais com mutação Gli3, entre outras anomalias, surgem alterações a nível da lobulação pulmonar (Perl, 1999). Se houver mutação simultânea dos genes Gli2 e Gli3, os murganhos não formam traqueia, esófago e pulmão, e os restantes derivados do intestino anterior são hipoplásticos (Motoyama, 1998; Perl, 1999). Estes resultados mostram que durante o desenvolvimento do intestino anterior, os factores Gli2 e Gli3 têm funções específicas e que estes se sobrepõem ao sinal SHH, sugerindo que as mutações nos genes Gli podem estar directamente envolvidas nas malformações do intestino anterior (Motoyama, 1998). Os botões pulmonares formam-se independentemente da Shh, no entanto, a sua ramificação e proliferação requerem a interacção epitélio-mesênquima, interacção essa que é fortemente influenciada pela via SHH-Gli, como veremos posteriormente (Perl, 1999; Kumar, 2005).

O **factor de crescimento do fibroblasto-10** (FGF-10) pertence a uma família de polipeptídeos cuja tradução requer um receptor, neste caso o FGFR2, que activa uma variedade de mecanismos intracelulares essenciais para o controlo da proliferação, migração e diferenciação celular (Cardoso, 2004).

O FGF-10 está expresso no mesênquima, na zona onde irá surgir o botão, e ao ser libertado, liga-se ao receptor FGFR2 presente na endoderme induzindo a formação do botão (Bellusci, 1997b).

Nos murganhos com mutação homozigótica *Fgf-10 -/-*, o botão primário não se desenvolve e conseqüentemente não se formam os pulmões (Bellusci, 1997b; Sekine, 1999). Estes animais apresentam letalidade peri-natal, não desenvolvem membros, nem pulmões e árvore brônquica, no entanto têm uma traqueia normal (Min, 1998; Sekine, 1999).

O mesmo fenótipo foi observado nos animais com mutação homozigótica para o receptor do *Fgfr-2 -/-*, isto é, ausência de membros, pulmões e árvore brônquica, mas uma traqueia normal (Arman, 1999).

Os estudos anteriores permitem afirmar que o FGF-10 é essencial para a formação do botão dos membros e para a ramificação inicial dos brônquios primordiais, não sendo necessário para a extensão do sulco laringotraqueal, uma vez que a traqueia se desenvolve normalmente (Min, 1998; Arman, 1999). O FGF-10 é um mediador essencial na interação mesênquima-epitélio, o que é fundamental para o desenvolvimento pulmonar, nomeadamente na morfogénese da ramificação da árvore brônquica (Bellusci, 1997b; Sekine, 1999; Min, 1998).

A **proteína morfogénica do osso-4 (BMP4)** está envolvida em vários eventos embriológicos, nomeadamente no desenvolvimento pulmonar. A sua expressão foi detectada antes da fase de gastrulação, na ectoderme extra-embriónica, onde é segregada e parece regular o destino das células do epiblasto proximal (Lawson, 1999).

Nos murganhos com mutação homozigótica do gene *Bmp4 -/-*, não se formou alantoide, não foram observadas células germinativas primordiais e os animais morreram por volta do dia de gestação E10, impedindo assim o estudo do desenvolvimento pulmonar (Lawson, 1999).

Winnier e colaboradores, também estudaram os murganhos com esta mutação, no entanto estes animais apresentavam um fenótipo variável e morriam entre os dias de gestação E6,5 e E9,5. A maioria dos embriões não ultrapassava a fase de cilindro, não expressava o marcador mesodérmico T e apresentava pouca ou nenhuma diferenciação mesodérmica. Alguns embriões conseguiam desenvolver-se até à fase em que se forma a dobra da cabeça ou até à fase em que se iniciam os batimentos cardíacos, no entanto, apresentavam um desenvolvimento atrasado, estruturas posteriores desorganizadas e redução na mesoderme extraembriónica (Winnier, 1995).

Estes trabalhos apresentam evidências de que no início do desenvolvimento embrionário do murganho, a BMP4 é vital para vários processos, nomeadamente para a gastrulação e formação da mesoderme (Winnier, 1995; Lawson, 1999).

**Os retinóides**, que são derivados da vitamina A, têm um importante papel na homeostase e no desenvolvimento de vários órgãos, incluindo o pulmão (Mendelsohn, 1994). Apesar dos efeitos teratogénicos da vitamina A durante a organogénese e da sua participação no desenvolvimento pulmonar ainda não estar clarificada, existem evidências de que o ácido retinóico (AR) é requerido para o início da formação do botão e para a diferenciação da endoderme (Desai, 2006; Desai, 2004). Os fetos de ratos com uma dieta com défice de vitamina A, apresentaram graves malformações congénitas, nomeadamente anomalias nos olhos, aparelho respiratório (estenose traqueal e agenesia pulmonar), coração e grandes vasos, sistema urogenital, diafragma, timo, tiróide e paratiroide (Mendelsohn, 1994). Dickman e colaboradores, comprovaram que a privação aguda de vitamina A era responsável por vários tipos de lesões, entre as quais a traqueia em fundo de saco e a agenesia pulmonar (Dickman, 1997). A participação do AR é essencial para o início da formação dos botões pulmonares, facto comprovado pela agenesia pulmonar observada nos ratos com deficiência em vitamina A (Mendelsohn, 1994; Dickman, 1997) e nos ratos sujeitos à administração de antagonistas da vitamina A (Cardoso, 2004).

No murganho foi possível verificar que no dia de gestação E9,5, altura em que os botões primordiais se formam, o sinal do AR está localmente activo, sendo detectado no intestino anterior, no mesênquima da traqueia e no primórdio pulmonar, elevados níveis de expressão da enzima envolvida na síntese de AR, a RALDH-2. Nesta fase a abundante síntese e utilização do AR pelo intestino anterior, suporta a hipótese do seu envolvimento directo na formação do botão primordial pulmonar (Malpel, 2000). De facto, os embriões de murganho com mutação homocigótica *Raldh2* <sup>-/-</sup>, apresentam vários defeitos na organogénese (Niederreither, 1999; Zhao, 1996). Estes embriões morrem a meio da gestação (dia E10,5) sem sofrerem rotação axial, sem formarem os botões dos membros, com um encurtamento ao longo do eixo anterior/posterior e com o coração formado por uma cavidade simples e dilatada (Niederreither, 1999). Assim podemos dizer que o ácido retinóico, é imprescindível para a sobrevivência do murganho e para o início da morfogénese (Niederreither, 1999; Zhao, 1996).

A acção do AR parece ser indirecta ao controlar a expressão de outros genes, pois o AR presente no intestino primitivo anterior mantém o nível de TGF- $\beta$

baixo na mesoderme, o que permite a expressão do FGF-10 e o início do botão pulmonar (Chen, 2007).

### **Fase embrionária – assimetria pulmonar**

A assimetria pulmonar está ligada ao plano geral do corpo, isto é, antes de surgirem os órgãos primordiais, a assimetria esquerdo/direito dos mesmos já foi determinada. É conseguida por uma cascata de sinais onde estão envolvidos cinco membros da família TGF- $\beta$ : **Lefty-1, Lefty-2, Nodal, Pitx-2 e GDF-1** que se expressam no embrião em locais diferentes (Meno, 1997; Meno, 1998; Lowe, 2001; Hamada, 2002; Cardoso, 2006). O gene Nodal está expresso no lado esquerdo do embrião, o Pitx-2 na mesoderme lateral esquerda (ML), Lefty-2 na ML esquerda e um pouco no lado esquerdo do sulco (S) e o Lefty-1 no lado esquerdo do sulco (Meno, 1997; Meno, 1998).

Para estudar como actuam estes genes no controlo da assimetria bilateral, foram utilizados modelos experimentais com animais geneticamente mutados, o que permitiu um enquadramento funcional de alguns genes.

Os murganhos com mutação homozigótica Lefty-1  $-/-$  apresentam vários defeitos, sendo o mais comum, o isomerismo do pulmão esquerdo (monolobos bilaterais do pulmão) e o mau posicionamento das vias cardíacas e outros vasos sanguíneos. Nestes animais, ainda foram observadas alterações no padrão de expressão dos genes Lefty-2, Nodal e Pitx-2 (Meno, 1997; Meno, 1998). Estes resultados sugerem que o Lefty-1 regula a expressão dos genes Lefty-2 e Nodal, restringindo-os ao lado esquerdo e que será o Lefty-2 ou o Nodal, ou eventualmente ambos, que determinam o lado esquerdo do embrião. Quanto ao Pitx-2, parece estar envolvido no posicionamento dos órgãos viscerais (Meno, 1997; Meno, 1998; Lowe, 2001).

O **factor de crescimento/diferenciação GDF-1**, mais um membro da família TGF- $\beta$ , também parece participar no estabelecimento da assimetria do embrião. A expressão do GDF-1 é simétrica e detectada por volta do dia gestação E8-E8,5 no nó primitivo, ectoderme neural e mesoderme lateral (Rankin, 2000). Nos murganhos com deleção homozigótica Gdf-1  $-/-$ , foi observada disposição aleatória dos órgãos viscerais e alteração na disposição dos órgãos torácicos (Rankin, 2000). A nível da cavidade torácica, os pulmões apresentam 8 lobos, distribuídos simetricamente em relação ao eixo, e existem alterações no posicionamento do coração e dos grandes vasos. Além disso, não foi detectada expressão dos genes Lefty-1, Nodal e Pitx2, o que permite considerar que o GDF-

1 participa na assimetria do embrião, ao regular outros factores, nomeadamente Lefty-1, Nodal e Pitx2 (Rankin, 2000).

O ácido retinóico (AR) também parece estar envolvido neste processo, pois na sua ausência, os genes Lefty, Nodal e Pitx2 não se expressam. Pelo contrário, quando há excesso de AR, observa-se uma expressão simétrica destes genes, o que compromete a assimetria e evidencia o papel do ácido retinóico no estabelecimento do lado esquerdo do embrião (Chazaud, 1999).

Outro factor que pode estar envolvido na assimetria esquerdo/direito é o factor hepatocitário nuclear (HNF-4), detectado no feto humano e de murganho, no pulmão, espermatíde, oviducto, plexo coróide e rim (Chen, 1998b).

### **Fase pseudoglandular - Morfogénese da árvore respiratória**

Durante a morfogénese da ramificação, estabelece-se a árvore brônquica, processo que começa com a formação dos botões primários e que acontece maioritariamente na fase pseudoglandular, prolongando-se pela fase canalicular.

A ramificação padronizada, tem início com o alongamento dos botões iniciais, seguindo-se a ramificação das suas unidades terminais, o que se repete nos novos botões formados. O processo de ramificação dicotómica é conseguido por controlo local da proliferação e morte celular, sendo necessários sinais para promover a divisão celular nos bordos dos botões em crescimento e sinais para inibir a proliferação nos pontos de ramificação (Cardoso, 2004). A regulação da ramificação envolve interacções epitélio-mesênquima, através dos componentes da matriz (Hilfer, 1996), dos factores de crescimento, nomeadamente do factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento plaquetar (PDGF), factor de crescimento da insulina (IGF1 e IGF2), factor de crescimento hepático (HGF), factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) e ainda do ácido retinóico (McGowan, 2004b).

O crescimento diferencial do epitélio e do mesênquima envolvente e as interacções epitélio-mesênquima têm um papel fundamental na regulação e diferenciação da árvore brônquica (Hilfer, 1996). De facto, observou-se que a remoção do mesênquima adjacente à endoderme embrionária impedia o crescimento, a morfogénese e a citodiferenciação do epitélio embrionário pulmonar, sendo fundamental a manutenção de uma determinada quantidade de mesênquima para que ocorra a interacção e o desenvolvimento pulmonar (Masters, 1976).

A **composição da matriz extracelular** parece determinar onde o túbulo em desenvolvimento se dividirá, o que acontece por exemplo com o colagénio, que quando está presente em bandas, impede a ramificação proximal (Hilfer, 1996).

A fibronectina que aumenta durante a fase pseudoglandular, precisamente quando há morfogénese da ramificação, distribui-se na zona da fenda, onde irá desempenhar um papel importante na ramificação pulmonar (Roman, 1997).

Não se sabe ao certo de que forma a **lâmina basal e a matriz mesenquimatosa** regulam a ramificação, mas esta poderá actuar como uma barreira física, ou como um filtro, ou poderá sequestrar ou favorecer a ligação de certos factores de crescimento (Hilfer, 1996).

Na regulação do processo de ramificação são conhecidos alguns factores do crescimento, entre os quais se destacam o TTF-1 e o FGF-10, este último a principal força da ramificação, assim como diversas moléculas, nomeadamente a glicoproteína SHH e a BMP4 (Cardoso, 2000).

O **factor de transcrição da tiróide (TTF-1)** pode ser encontrado na tiróide primordial, prosencéfalo, pituitária e epitélio pulmonar, sendo essencial para o desenvolvimento destes órgãos (Kimura, 1996; Zhou, 1996).

No pulmão do rato e murganho, o TTF-1 foi detectado no dia de gestação E10 nas células epiteliais brônquicas dos botões em formação, e no dia E11 estava abundantemente expresso no epitélio da traqueia e epitélio dos brônquios principais e lobares (Zhou, 1996). Entre os dias E11 e E16, são expressos elevados níveis de TTF-1 na traqueia, brônquios, bronquíolos e botões acinares distais e um dia mais tarde (E17), foi detectado nas células epiteliais que revestem as passagens aéreas e no pulmão distal, estando restrito às células tipo II, padrão que foi mantido no dia E18 e na vida adulta (Zhou, 1996).

No pulmão humano, entre a 11<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana de gestação, o factor TTF-1 foi observado nas células epiteliais cilíndricas não ciliadas e na 17<sup>a</sup> semana, nas células cilíndricas e cúbicas não ciliadas das passagens aéreas (Stahlman, 1996). Mais tarde, entre a 36<sup>a</sup> e a 42<sup>a</sup> semana de gestação, foram as células alveolares tipo II e as células bronquiolares a expressarem o TTF-1 (Stahlman, 1996).

Os murganhos com mutação homocigótica Ttf-1 <sup>-/-</sup>, morrem logo após o nascimento, com defeitos no prosencéfalo, sem tiróide e com pulmões hipoplásicos (Kimura, 1996). O estudo detalhado do seu fenótipo, permitiu verificar que não ocorreu a separação dorso-ventral da traqueia e do esófago, formando-se um tubo único que liga a laringe com o esófago, isto é, uma fístula traqueoesofágica (Mino, 1999). Estes animais apresentaram dois brônquios

principais, que não se dividem e que abrem em sacos dilatados, formando uma árvore respiratória rudimentar, o que indica que o desenvolvimento pulmonar parou na fase pseudoglandular (Kimura, 1996; Minoo, 1999).

As alterações pulmonares resultantes da inactivação do gene Ttf-1, indicam a sua participação na ramificação da árvore brônquica, na diferenciação epitelial, no desenvolvimento das estruturas distais do pulmão e expressão das proteínas do surfactante (Minoo, 1995; Kimura, 1996; Zhou, 1996; Stahlman, 1996; Minoo, 1999; Boggaram, 2009).

Dos vários **factores de crescimento do fibroblasto** (FGFs) potencialmente envolvidos no desenvolvimento pulmonar, e mais especificamente na morfogénese da árvore respiratória, salientamos o FGF-10, FGF-7 e FGF-1, cuja participação está extensamente comprovada e descrita (Cardoso, 2004). Para uma adequada tradução do seu sinal, é necessário que o factor de crescimento e respectivo receptor (FGFR 1-4), interajam com o proteoglicano sulfato de heparano, e formem um complexo estável (FGF-FGFR).

O **FGF-10**, funciona como um regulador do desenvolvimento do cérebro, dos pulmões e dos membros, o que foi comprovado pelo estudo em murganhos com mutação do Fgf-10, os quais morrem logo após o seu nascimento, sem apresentarem pulmões e membros superiores e inferiores (Min, 1998; Sekine, 1999). Na parte distal da traqueia destes animais, não se desenvolvem os botões primários esquerdo e direito, o que impossibilita o desenvolvimento da árvore brônquica. No caso dos membros, observa-se a formação do botão, no entanto não há crescimento (Min, 1998; Sekine, 1999).

A nível pulmonar o FGF-10 é requerido para a normal ramificação, expressão de outros genes envolvidos na ramificação, nomeadamente BMP4 e SHH, e para o estabelecimento do padrão proximal-distal (Abler, 2009).

Nas fases iniciais do desenvolvimento pulmonar do murganho, por volta do dia de gestação E9,5, o FGF-10 está expresso no mesênquima distal dos locais onde vão surgir os botões, promovendo o crescimento e ramificação da endoderme do pulmão distal (Bellusci, 1997b).

Este factor induz a endoderme a crescer na sua direcção, isto é, tem um efeito quimioatractivo e mitogénico, sendo necessário um determinado gradiente para evitar a formação aleatória de novos botões (Bellusci, 1997b; Park, 1998; Weaver, 2000). Após o crescimento do botão, o FGF-10 induz o desenvolvimento de um novo botão, e assim um novo ciclo de indução e crescimento será iniciado.

Os botões formados ramificam-se e os ramos crescem em direcção às regiões com elevada expressão de FGF-10 (Bellusci, 1997b).

Ao que parece, a endoderme liberta sinais inibidores que regulam a transcrição do FGF-10 na mesoderme (Bellusci, 1997b). A glicoproteína SHH será um desses reguladores, pois quando a endoderme expressa baixos níveis de SHH, aumenta a expressão de FGF-10 ou se pelo contrário expressar elevados níveis de SHH, o mesênquima não apresenta FGF-10 (Bellusci, 1997a). O ácido retinóico também estará envolvido no controlo do FGF-10, mas fá-lo indirectamente via SHH, ao afectar a expressão de SHH (Bellusci, 1997a).

De facto o FGF-10 tem um papel importante na mediação das interacções entre o mesênquima e o epitélio pulmonar, e o seu efeito modulador, permite determinar a localização e a formação do botão (Sekine, 1999; Park, 1998), no entanto, a progressão da ramificação depende da interacção com outros sinais mitogénicos do mesênquima, nomeadamente com o FGF-7 (Park, 1998).

Os **factores de crescimento FGF-7 e FGF-1**, também induzem a proliferação epitelial, no entanto o efeito mais potente é realizado pelo FGF-7 (Cardoso, 1997).

Num trabalho *in vitro* com tecido epitelial pulmonar, foi possível observar que a exposição ao FGF-7, induzia a formação de estruturas com aspecto quístico, enquanto a exposição ao FGF-1, causava o aparecimento de botões do tipo ramificado (Cardoso, 1997). Esta diferença morfológica no efeito proliferativo, parece estar relacionada com a localização dos seus receptores. O FGF-7 liga apenas o receptor FGFR-2, que se encontra distribuído uniformemente pelo tecido pulmonar, enquanto o FGF-1 se liga aos receptores FGFR-2 e FGFR-4, este último no topo do botão distal. Assim, o aspecto quístico observado com FGF-7, resulta da proliferação generalizada e o aspecto de botão ramificado com FGF-1, surge devido à proliferação no topo dos botões (Cardoso, 1997).

O FGF-7 possui a capacidade de promover a proliferação da endoderme, não conseguindo exercer a acção quimioatractiva do FGF-10 (Weaver, 2000). A sua ausência não provoca anomalias na morfologia do pulmão, e portanto não é essencial ao normal desenvolvimento pulmonar (Perl, 1999; Guo, 1996). No entanto, a elevada expressão de FGF-7 em murganhos transgénicos causa letalidade dos embriões (Simonet, 1995). Os pulmões destes embriões apresentam alterações na ramificação, com passagens aéreas largas, pulmões císticos a ocupar toda a cavidade torácica e incompleta diferenciação epitelial (Simonet, 1995).

Nesta fase do desenvolvimento, também se encontram elevados níveis de **FGF-9**, sintetizado no epitélio pulmonar e mediado pelo receptor FGFR-1 presente no mesênquima. Os murganhos sem expressão deste factor apresentam hipoplasia pulmonar, como resultado da redução do tecido mesenquimatoso e uma diminuição na ramificação das passagens aéreas. No entanto, não se observaram alterações na saculação dos espaços aéreos periféricos e na citodiferenciação das células do epitélio alveolar (Wert, 2004).

À medida que o processo de ramificação prossegue nos botões, a troca de sinais entre as células do tecido epitelial e mesenquimatoso, estabelece um sistema de “feed-back” que é responsável pelo controlo do tamanho das passagens aéreas, do padrão de ramificação e pelo destino das células.

A **glicoproteína SHH** faz parte de um grupo de moléculas envolvidas no controlo da ramificação e que está presente em elevados níveis no epitélio do topo do botão distal (Bellusci, 1996; Bellusci, 1997a). No murganho, está expressa na endoderme ventral do intestino anterior ao dia de gestação E9,5, precisamente na altura em que se formam os botões primários (Bellusci, 1997a).

Os animais com mutação homozigótica *Shh* <sup>-/-</sup> apresentaram alterações graves na ramificação da árvore brônquica, formando pulmões com sacos rudimentares, o que evidencia o papel essencial de SHH na ramificação pulmonar (Litingtung, 1998). Ao que parece, o mesênquima pulmonar é preferencialmente afectado pela falta de *Shh*, observando-se uma diminuição na proliferação celular e um aumento da morte celular (Litingtung, 1998).

Pelo contrário, nos animais com elevada expressão de *Shh*, houve um aumento da proliferação celular epitelial e mesenquimatoso, formando-se um pulmão com abundante mesênquima e com alvéolos não funcionais (Bellusci, 1997a).

Os “**sprouty**” (**Spry**) são um grupo de proteínas ricas em cisteína, que interagem com vários receptores, como por exemplo os receptores dos FGFs e EGF, podendo inibir do sinal FGF durante o processo de ramificação (Cardoso, 2006). Durante o desenvolvimento fetal do murganho foram identificados, em diferentes órgãos, três genes homólogos, o *mSpry1*, *mSpry2* e *mSpry4*. O *mSpry4* está expresso no mesênquima do pulmão distal do murganho entre os dias de gestação E11,5-E12,5 (de Maximy, 1999). No rato o *mSpry2* está expresso no bordo dos botões epiteliais em crescimento, limitando a proliferação ou migração celular ao ligar-se ao receptor do FGF-10 (Cardoso, 2006).

A **proteína morfogénica do osso** (BMP4) está envolvida em vários eventos embriológicos, e no caso do pulmão, exerce um efeito oposto ao do FGF-10 na indução da formação dos botões (Weaver, 2000). Na fase inicial do desenvolvimento pulmonar, está expressa no mesênquima ventral do intestino anterior e nos botões primordiais pulmonares (Weaver, 1999), mas à medida que a organogénese prossegue, a expressão fica mais abundante, e durante o processo de ramificação, localiza-se no topo dos botões distais (Bellusci, 1996; Weaver, 1999).

É essencial que a expressão da BMP4 se restrinja ao epitélio distal, caso contrário, formam-se os botões separados por abundante mesênquima e os pulmões ficam mais pequenos (Bellusci, 1996). A elevada expressão de BMP4, inibe a proliferação celular e/ou promove a morte celular (Bellusci, 1996). De facto elevados níveis de BMP4, reduzem a proliferação da endoderme, tendo assim um efeito oposto ao do FGF-10 (Weaver, 2000).

O nível da BMP4 no epitélio do topo dos botões em crescimento, parece ser determinado pelo gradiente de FGF-10 presente nas células mesenquimatosas vizinhas, ou seja, um aumento de FGF-10, aumenta a expressão de BMP4. Uma vez que a BMP4 antagoniza o efeito do FGF-10, podemos dizer que a interacção entre ambos limita o crescimento do botão (Weaver, 2000). A BMP4 não parece ser necessária para a indução do botão, mas é parte do sinal distal que controla a proliferação e regula a diferenciação proximal-distal (Weaver, 2000).

Com base na relação existente entre FGF-10 e BMP4, Weaver e colaboradores estabeleceram um modelo de regulação da ramificação, no qual o FGF-10 presente no mesênquima promove a proliferação e quimioatração do epitélio do botão, para que cresça na sua direcção (Weaver, 2000; Bellusci, 1997b). À medida que a extensão ocorre, as células distais da endoderme detectam elevados níveis de FGF-10, o que indirectamente induz a expressão de BMP4 nos topos dos botões, onde actua como um inibidor do brotamento lateral, assegurando assim, a extensão de um só botão em vez de conjuntos de botões. Apenas a alguma distância do topo, onde os níveis de Bmp4 são baixos, se pode formar um novo botão (Weaver, 2000). De acordo com este modelo, os ramos laterais e as ramificações dicotómicas são controlados pelo FGF-10 presente no mesênquima local. No caso da ramificação lateral, o FGF-10 é expresso assimetricamente à medida que o botão se estende, levando ao aparecimento de um botão assimétrico. Na ramificação dicotómica, o FGF-10 expressa-se

simetricamente em ambos os lados do botão, levando ao aparecimento de botões pares (Weaver, 2000).

Os **factores de transformação e crescimento** (TGF) são moléculas de sinalização intracelular, que se ligam a receptores transmembranares serina/ treonina kinase, denominados de tipo I e tipo II. O pulmão em desenvolvimento, expressa **TGF- $\beta$ 1**,  **$\beta$ 2** e  **$\beta$ 3**, havendo um aumento da sua expressão nos locais de ramificação dos botões (Perl, 1999; Kumar, 2005). No murganho, entre o dia de gestação E11 e E12, o TGF- $\beta$ 1 está expresso no mesênquima sub-epitelial e a sua activação inibe a ramificação epitelial (Cardoso, 2001). Este factor promove a síntese da matriz extracelular, que ao depositar-se na interface epitélio-mesênquima, evita a ramificação local (Cardoso, 2001).

Nos murganhos transgênicos sem expressão de TGF- $\beta$ 1, os pulmões não se desenvolvem para além da fase pseudoglandular, apresentam baixos níveis de proteína surfactante SP-C e ocorrem alterações na formação dos vasos sanguíneos (Cardoso, 2001).

A acção do TGF- $\beta$ 1 na morfogénese pulmonar parece ser exercida por três mecanismos diferentes: limitando a proliferação epitelial do botão, inibindo a quimioatração mediada pelo FGF-10 e sintetizando os componentes da matriz para estabilizar as fendas (Cardoso, 2001).

O **factor de crescimento epidérmico** (EGF) promove a ramificação da árvore brônquica e o crescimento pulmonar. Participa no desenvolvimento do pulmão fetal e do pulmão em crescimento, estando também envolvido na normal regeneração das passagens aéreas ou na regeneração de patologias pulmonares agudas ou crónicas, podendo ainda ter papel na regulação do fluido pulmonar (Stahlman, 1989).

### **Fase Canalicular - Regulação da diferenciação proximal-distal**

Para que o pulmão seja funcional é necessário que as células epiteliais da árvore brônquica se vão diferenciando progressivamente ao longo do eixo proximal-distal.

A **BMP4**, já referida anteriormente, parece estar envolvida na diferenciação celular ao longo do eixo proximal-distal (Weaver, 1999).

Usando dois modelos animais para inibir o sinal BMP4, um com o bloqueio do sinal ao nível do ligando, utilizando um antagonista *Xenopus Noggin* (XNoggin) e o outro com o bloqueio do receptor tipo I (Alk6), foi possível verificar o envolvimento desta proteína na diferenciação celular (Weaver, 1999). Em ambos

os modelos, o pulmão desenvolve anomalias na diferenciação celular ao longo do eixo proximal-distal, observando-se na parte distal, um epitélio com características proximais (Weaver, 1999). Estes resultados suportam a hipótese de que uma redução da BMP4, inibe a diferenciação das células distais e promove a diferenciação das células proximais. Segundo estes autores, a endoderme no topo dos botões está exposta a elevados níveis de BMP4 e por isso mantém ou adopta características distais. À medida que o botão cresce e a endoderme deixa de estar sobre o domínio de BMP4, inicia-se a diferenciação proximal (Weaver, 1999).

O **factor hepatocitário nuclear (HFH-4)** está presente no homem nos tecidos reprodutores e no pulmão, mais especificamente no epitélio brônquico proximal (Pelletier, 1998). Na 15ª semana de gestação, a sua expressão pulmonar começa e à semelhança do rato/murganho, aumenta e permanece na vida adulta (Pelletier, 1998). No pulmão em desenvolvimento do rato e murganho, a expressão de HFH-4 surge no dia de gestação E14,5, restrita ao epitélio pulmonar dos túbulos brônquicos proximais. No dia E16,5 a expressão aumenta, mas mantém a sua localização no epitélio proximal, sendo também detectado no pulmão adulto (Hackett, 1995).

O facto da expressão do HFH-4 estar restrita ao epitélio brônquico proximal, é consistente com o seu papel na diferenciação celular do epitélio proximal e provavelmente com a regulação da expressão de genes brônquicos, nomeadamente o CCSP (proteína secretora das células de Clara) (Hackett, 1995; Pelletier, 1998; Tichelaar, 1999).

Além da BMP4 e HFH-4 existem outros factores que determinam o complexo padrão celular que reveste as passagens aéreas, mas que não foram abordados no trabalho (Maeda, 2007).

### **Fase de alveolização**

O processo de alveolização, que ocorre no pulmão distal, inclui o aparecimento e crescimento dos septos secundários, desenvolvimento de uma elaborada rede capilar, remodelação da parede alveolar e diferenciação do epitélio alveolar (Snyder, 2004).

No homem, a alveolização inicia-se com a septação secundária, etapa que se caracteriza pela formação de novos septos alveolares (Snyder, 2004) seguindo-se a etapa de adelgaçamento da parede alveolar, o que acontece por perda de células intersticiais, sendo acompanhada por um aumento da área

capilar, passando de uma rede capilar dupla para rede simples, o que acontece por fusão de dois capilares adjacentes (McGowan, 2004b).

A diferenciação e crescimento alveolar, que no homem se estende aproximadamente até aos dois anos de idade, são uma etapa onde há expansão do alvéolo à custa do tecido do septo alveolar, o que irá aumentar a área de trocas gasosas.

Embora a alveolização seja semelhante entre as espécies, há uma variação no tempo em que os acontecimentos ocorrem, podendo surgir na vida intra-uterina (espécies “precocial”), na vida pós-natal (espécies “altricial”), ou no caso do homem, no final da gestação e primeiros anos de vida.

Resumidamente apresentaremos alguns dos principais reguladores, subdivididos em dois temas distintos: estabelecimento e desenvolvimento da rede vascular, e regulação da septação, diferenciação do epitélio e rearranjo do interstício alveolar.

**O crescimento e diferenciação da rede vascular pulmonar** tem início nas fases de desenvolvimento canalicular e sacular, terminando na fase alveolar. Inicialmente, os capilares da parede do septo alveolar são formados por um sistema duplo, isto é, um capilar está associado a cada uma das superfícies do septo mas, à medida que a alveolização prossegue, a parede alveolar fica mais fina e o sistema vascular passa a ser simples.

No embrião do murganho a vascularização é realizada por dois processos, a vasculogénese, que consiste na formação de vasos sanguíneos a partir de angioblastos, e a angiogénese, que consiste na formação de novos vasos a partir dos pré-existentes (Wert, 2004).

A regulação do crescimento e modelagem vascular, ainda está pouco definida, no entanto sabemos que o principal regulador é o factor de crescimento vascular endotelial (VEFG), sintetizado no epitélio e segregado para o mesênquima onde se liga aos receptores VEGFr-1 (ou Flt-1 nos roedores e KDR no homem), VEGFr-2 (ou FLK-1) e VEGFr-3 (Wert, 2004).

Existe ainda um co-receptor, a neuropilina-1, que ao ligar a isoforma VEGF165 aumenta a ligação deste factor ao receptor KDR (Neufeld, 2002; Ito, 2000).

**O VEGF e seus receptores estão** expressos no pulmão em desenvolvimento, apresentando um pico no final da gestação e no início da vida neonatal e ao que parece, o VEGF será um quimioattractor das células endoteliais

e/ou também será requerido para a manutenção de determinados tipos de endotélio (Dumont, 1995).

Vários são os trabalhos que comprovam que a acção do VEGF não se restringe ao aspecto vascular. No trabalho realizado em murganhos transgênicos com elevada expressão de VEGF, os animais apresentaram várias anomalias vasculares, nomeadamente vasos ectópicos, aumento do diâmetro do lúmen e formação precoce dos vasos, para além de defeitos no desenvolvimento alveolar (Zeng, 1998). Nos seus pulmões, existia uma diminuição do número de botões acinares e sáculos, diminuição do tecido conjuntivo e inibição da diferenciação das células epiteliais alveolares tipo II e I, o que indica que a regulação espacial e temporal do VEGF e seu receptor, são essenciais para o normal crescimento e morfogénese das estruturas acinares (Zeng, 1998).

Num trabalho *in vitro*, este factor causou uma diminuição na quantidade de tecido conjuntivo, e um aumento na proliferação das células epiteliais, o que sugere um papel no crescimento e diferenciação epitelial (Brown, 2001).

O bloqueio crónico do receptor do VEGF, também mostrou que este factor induz apoptose nas células septais alveolares e causa lesões compatíveis com enfisema, como sejam a perda de septos e o alargamento dos espaços alveolares (Kasahara, 2000). A administração de uma única dose do bloqueador deste receptor no primeiro dia de vida dos ratos recém-nascidos, provoca redução no desenvolvimento vascular pulmonar, hipertensão pulmonar grave e alterações na alveolização, com menos alvéolos e espaços distais mais alargados (Le Cras, 2002).

Um resultado semelhante foi obtido com dois outros inibidores da angiogénese, a talidomida e fumagilina, que quando administradas a ratos recém-nascidos no pico do período de alveolização, causam uma redução do número de alvéolos, da densidade arterial e redução na proporção entre peso pulmão/corporal (Jakkula, 2000).

Todos estes trabalhos evidenciam a importância da angiogénese no normal desenvolvimento da alveolização, realçando em particular o importante papel do VEGF na angiogénese e a sua participação no desenvolvimento das estruturas alveolares.

No período de alveolização do pulmão pós-natal, existe uma relação funcional entre o desenvolvimento dos capilares pulmonares e a formação dos alvéolos, no entanto, esta ainda não é conhecida. Na displasia broncopulmonar (DBP) são característicos os defeitos na formação dos vasos sanguíneos e na

alveolização. O tecido pulmonar das crianças que morrem com DBP, apresenta um decréscimo na expressão de VEGF e seus receptores, o que nos permite considerar que estas anomalias microvasculares alveolares, podem resultar de danos na expressão do VEGF e nos receptores angiogénicos endoteliais (Bhatt, 2001).

Nos ratos sujeitos a hiperóxia e tratados com VEGF durante o período neonatal, observaram-se melhorias na arquitectura pulmonar, aumentando a septação, a alveolização e o crescimento vascular (Kunig, 2005). Pensa-se que esta restauração da arquitectura pulmonar, poderá evitar o desenvolvimento da DBP nos prematuros (Kunig, 2005).

Existem **outros mediadores** da angiogénese e vasculogénese cujo papel no desenvolvimento pulmonar ainda se encontram em fase de estudo. Como exemplos, temos as **angiopoietinas**, **efrinas** e **semaforinas**, com reconhecida função na angiogénese de outros sistemas de órgãos, mas que também se encontram presentes no pulmão, onde exercem um papel importante no processo de alveolização (Loughna, 2000; Kullander, 2002; Neufeld, 2002).

As **angiopoietinas** que estão presentes nas células endoteliais, ligam-se a um grupo de receptores denominados – **Tie**, e que juntamente com VEGF e seus receptores, influenciam a angiogénese (Loughna, 2001). O receptor Tie2 foi detectado nas células endoteliais do pulmão do murganho, no dia de gestação E7,5, enquanto o receptor Tie1 se encontra ligeiramente mais tarde (E8), sendo que ambos mantêm a sua expressão durante o desenvolvimento pulmonar (Loughna, 2001). Estes receptores provaram ser fundamentais para o desenvolvimento, uma vez que os embriões com mutação homozigótica Tie2 (Tie2 -/-) morrem entre o dia de gestação E9,5-E10,5, apresentando extensas malformações vasculares (Loughna, 2001). É indiscutível que estes receptores participam na formação e/ou manutenção da rede vascular, e que o Tie2 actua mais cedo que o Tie1 (Loughna, 2001).

Até à data foram identificadas as angiopoietinas 1 e 2 (Ang1 e Ang2), sendo que ambas se ligam ao receptor Tie2. Quando a Ang1 liga o Tie2 induz a fosforilação da tirosina do receptor, mas ao contrário do VEGF, não induz a proliferação das células endoteliais. Ao que parece, a Ang1 está envolvida na interacção entre as células endoteliais e as células envolventes, e na manutenção da estabilidade vascular (Loughna, 2001). A Ang2 não induz fosforilação no receptor, mas bloqueia a activação deste, actuando assim como um antagonista da via Ang1/Tie2 (Loughna, 2001).

Foram ainda identificadas as Ang4 e Ang3, que são isoformas da Ang1 e 2 respectivamente. A Ang3 foi detectada no murganho e a Ang4 detectado no homem e, à semelhança das anteriores, a Ang4 activa o receptor Tie2, e a Ang3 funciona como antagonista (Loughna, 2001).

**As efrinas** são proteínas sinalizadoras ligantes dos receptores da família EPH, que estão ligadas à membrana celular, sendo muitas delas consideradas moléculas de sinalização intracelular, importantes para o controle das alterações morfológicas durante a embriogénese. Existem duas subclasses de efrinas, a subclasse A que se liga à membrana celular pelo glicofosfatidilinositol e a subclasse B, que têm um domínio transmembranar seguido de uma pequena região citoplasmática (Kullander, 2002). São várias as funções atribuídas às efrinas, entre as quais se incluem o desenvolvimento vascular, migração celular, regulação do axónio e plasticidade sináptica. A efrina-B2 está envolvida na remodelação vascular embrionária, no entanto, o seu papel no desenvolvimento pulmonar ainda continua desconhecido (Kullander, 2002).

**As semaforinas** são uma classe de factores de crescimento recentemente descrita, que inicialmente foram detectadas no sistema nervoso central. Estão subdivididas em sete classes, sendo a mais estudada a classe 3 (Sema3) que se liga aos receptores denominados de neuropilinas (Np) (Ito, 2000; Kagoshima, 2001; Neufeld, 2002). A classe Sema3 apresenta seis subclasses, as 3A, 3B, 3C, 3D, 3E e 3F, algumas delas presentes no pulmão em desenvolvimento (Ito, 2000; Kagoshima, 2001; Neufeld, 2002). Verificou-se que a Sema3A regula negativamente a morfológene da ramificação pulmonar fetal, e que esse efeito inibitório é mediado pelo receptor Np1 (Ito, 2000). As Sema3C e 3F estão presentes no pulmão embrionário de murganho, onde estimulam a morfológene da ramificação ao promoverem a proliferação celular, tendo assim um efeito oposto ao da Sema3A (Kagoshima, 2001).

Os receptores neuropilinas são proteínas transmembranares, tendo sido identificadas a **neuropilina 1** (Np1) e a **neuropilina 2** (Np2). O receptor Np1 liga a Sema3A, induzindo o colapso do crescimento do cone neuronal em determinados neurónios. Para além das células neurais, este receptor também pode ser expresso no pulmão, coração e osso, o que sugere a sua interacção na morfológene de tecidos não neurais (Ito, 2000). A Np2 liga as semaforinas 3F, 3B e 3C, embora estas também se possam ligar à Np1 (Ito, 2000; Neufeld, 2002).

Como referimos anteriormente, o receptor Np1 além de ligar as semaforinas também é um co-receptor da isoforma VEGF-165, cujo principal receptor é KDR

(Neufeld, 2002; Ito, 2000). Assim é possível dizer que, durante o desenvolvimento pulmonar, a Np1 apresenta duas funções: uma no início do desenvolvimento, durante a morfogénese da ramificação, onde actua como receptor da Sema 3A, e mais tarde na vascularização, como receptor do VEGF (Ito, 2000).

Os factores **de crescimento PDGF-A e PDGF-B** também modelam o desenvolvimento vascular, funcionando como mitogénicos e quimioatractivos para as células mesenquimatosas que vão fazer parte da parede do vaso. Logo que estas células contactam com o endotélio, diferenciam-se em células musculares lisas, provavelmente pela activação e secreção do TGF- $\beta$ , que por sua vez inibe mais proliferação endotelial e estimula a deposição dos componentes da matriz (elastina e colagénio) pelas células musculares lisas. Além do PDGF e TGF- $\beta$ , as células endoteliais segregam outros factores de crescimento que estimulam a proliferação celular, por exemplo EGF/TGF- $\alpha$ , FGF-1, FGF-2, IGF-I e IGF-II, e outros que a inibem, como factor de necrose tumoral- $\alpha$ , sulfato de heparano, todos eles importantes na proliferação e diferenciação celular (Wert, 2004).

O desenvolvimento vascular está ainda dependente da interacção com os componentes da matriz extracelular. A **fibronectina** (FN), componente da membrana basal capilar, liga-se às células endoteliais, sendo importante para o início da formação do tubo capilar. Também promove a migração e proliferação celular e previne apoptose (George, 1993).

Os murganhos com deleção heterozigótica do gene da Fn (Fn +/-) são normais, férteis e viáveis até aos dois anos, mas apresentam metade do nível plasmático normal de fibronectina (George, 1993). Os animais homozigóticos (Fn-/-), morrem in útero e apresentam malformações que advêm do défice quantitativo de mesoderme. As anomalias parecem resultar de uma deficiente migração, proliferação ou diferenciação da mesoderme, como resultado da ausência de fibronectina (George, 1993).

A **laminina**, outro componente da matriz celular, promove a adesão, migração, diferenciação e crescimento celular (Kubota, 1988; Nguyet, 2006). *In vitro*, certas lamininas fomentam a formação do tubo vascular, induzindo assim a angiogénese (Kubota, 1988).

O **colagénio tipo IV**, principal componente da membrana basal matura, também se liga às células endoteliais e promove a adesão celular e a citodiferenciação. O colagénio IV expressa-se mais tarde que a laminina, mas

embora ambos promovam a angiogénese, parece que a laminina será o principal promotor (Kubota, 1988).

### **Regulação da septação, da diferenciação do epitélio e rearranjo do interstício alveolar.**

O **factor de crescimento derivado plaquetário** (PDGF) é um dímero de cadeias A ou B (ou ambas), que exerce a sua função interagindo com dois receptores tirosina-kinases – o PDGFR- $\alpha$  e PDGFR- $\beta$ . O receptor PDGFR- $\beta$  liga os factores tipo PDGF-B e PDGF-D e o receptor PDGFR- $\alpha$  liga todos os quatro PDGFs (A, B, C e D).

O PDGF é um potente mitogénico, com acção sobre várias células do tecido conjuntivo, nomeadamente nas células musculares lisas e nos fibroblastos, podendo ainda actuar nas células de glia (Bostrom, 1996; Bostrom, 2002).

Antes da implantação do embrião de murganho, o **PDGF-A** e receptor PDGFR- $\alpha$  são co-expressos, o que sugere uma interacção autócrina, mas depois da implantação o PDGF-A está expresso no epitélio e o receptor no mesênquima adjacente, o que evidencia a acção parácrina existente (Bostrom, 1996). Entre os dias de gestação E14,5 e E16,5, o RNAm do PDGF-A está expresso nos túbulos epiteliais proximal e distal e o receptor no mesênquima envolvente, promovendo a multiplicação e a migração das células mesenquimatosas, fundamentais para a morfogénese pulmonar (Lindahl, 1997).

Cerca de metade dos murganhos com deleção homocigótica Pdgf-A (Pdgf-A  $-/-$ ) morrem até ao dia de gestação E10 e os que sobrevivem sofrem um atraso no desenvolvimento. Destes, cerca de 30% acabam por morrer logo após o nascimento e os que atingem as 3 a 4 semanas de idade, desenvolvem enfisema pulmonar e hipertrofia cardíaca (Bostrom, 1996). Os seus pulmões apresentam um parênquima com cavidades cheias de ar, há ausência de septos alveolares, e ao nível do interstício alveolar, há ausência de miofibroblastos alveolares (MFA), e quase não existem fibras elásticas (Bostrom, 1996; Lindahl, 1997).

Os murganhos sem receptor PDGFR- $\alpha$ , e portanto incapazes de receber o sinal dos PDGF-A, B e C, permitiram evidenciar a importância do receptor e do factor de crescimento na proliferação de um determinado tipo de células, que serão as células precursoras dos miofibroblastos alveolares (MFA) (Bostrom, 2002).

Usando murganhos *Pdgf-A* <sup>-/-</sup>, Lindahl e seus colaboradores identificaram as potenciais células progenitoras dos MFA e mostraram que a falha na alveolização presente nestes animais, se deve ao bloqueio na proliferação e migração das células progenitoras durante a fase canalicular, causando ausência de MFA e conseqüentemente, falta de elastina nos septos alveolares (Lindahl, 1997).

O PDGF-A participa activamente na migração, proliferação e diferenciação dos MFA (Bostrom, 1996; Lindahl, 1997). Os miofibroblastos alveolares (MFA), são fibroblastos intersticiais que expressam actina- $\alpha$ , e tem um papel importante durante o desenvolvimento pulmonar (Noguchi, 1989; Bostrom, 1996). Estão presentes nos septos primários, onde são a fonte de elastina septal, precisamente no local onde ocorre o alongamento do septo (Noguchi, 1989). Se considerarmos que os miofibroblastos alveolares são a fonte de elastina septal (Noguchi, 1989; Bostrom, 1996; Lindahl, 1997; McGowan, 2004b), que o aumento da tropoelastina na fase pré-natal se deve ao aumento da população de MFA (Noguchi, 1989) e que a elastina tem um papel relevante na alveologénese, podemos concluir que o PDGF-A é um importante regulador da alveolização (Bostrom, 1996; Bostrom, 2002).

Os **glicocorticoides** são hormonas esteroides produzidas pela glândula supra-renal, em resposta à hormona adrenocorticotrófica (ACTH) da hipófise, que se ligam aos receptores citoplasmáticos – receptor glicocorticoide (RG), membros da família de factores de transcrição. Existem dois receptores RG- $\alpha$  e RG- $\beta$ , mas ao que parece o beta não liga os glicocorticoides, mas tem a função de reprimir a actividade do alfa (Bolt, 2001).

Faz algum tempo que se considera que os glicocorticoides participam no desenvolvimento pulmonar (Pierce, 1995; Muglia, 1999) e na produção de surfactante, mais especificamente no aumento dos níveis de proteínas surfactantes (SP) e de fosfolípidos (Bolt, 2001; Odom, 1988). Promovem a maturação das células epiteliais, estimulam a diferenciação das células tipo II, diminuem os tecidos intersticiais, inibem a síntese de DNA e inibem o edema pulmonar (Bolt, 2001).

De facto, o aumento do cortisol na circulação fetal coincide com os eventos de maturação alveolar, nomeadamente, a síntese de surfactante, o adelgaçamento das paredes septais alveolares e a passagem de um sistema capilar duplo para um simples (Bolt, 2001).

As observações realizadas em murganhos com deleção genética da hormona libertadora de corticotropina (CRH) colocam em evidência o papel dos

glicocorticoides no desenvolvimento pulmonar, uma vez que estes animais morrem logo após o nascimento, devido a falha respiratória por inadequado desenvolvimento do pulmão (Muglia, 1999). Estes resultados sugerem que os glicocorticoides endógenos têm maior efeito na proliferação celular e na maturação da arquitetura pulmonar, do que na expressão de surfactante, já que a produção de surfactante não é afectada (Muglia, 1999). É nitidamente visível que os glicocorticoides actuam na maturação das células epiteliais e mesenquimatosas do pulmão, conduzindo a alterações na proliferação e diferenciação das células de Clara, sendo mínimos os seus efeitos ao nível do surfactante (Muglia, 1999).

Um resultado semelhante foi obtido em murganhos sem receptores RG, que apresentaram morte perinatal, pulmões estruturalmente imaturos e com colapso dos alvéolos (atelectasia), mas pouca alteração nos componentes do surfactante (Cole, 1995).

Os glicocorticoides são ainda importantes moduladores da produção da elastina (Pierce, 1995). A dexametasona, quando administrada em ratos gestantes em fase terminal de gestação, aumenta o número de células que expressam tropoelastina (TE) e aumenta a expressão de TE, o que influencia o adequado desenvolvimento dos espaços aéreos terminais (Pierce, 1995).

Também podem promover a produção de certos factores de crescimento e respectivos receptores, o que indirectamente, estimula a prematura diferenciação pulmonar, à custa de mais crescimento e desenvolvimento pulmonar (Bolt, 2001).

Frequentemente são administrados glicocorticoides para reduzir o risco do desenvolvimento do síndrome da dificuldade respiratória (SDR) no recém-nascido (Liggins, 1972) e para evitar a DBP na vida pós-natal (Bolt, 2001).

No entanto existem alguns estudos com modelos animais, em que foram observados alguns **efeitos adversos** do uso dos glicocorticoides ao nível do crescimento pulmonar (Massaro, 1985; Massaro, 1986).

Nos ratos tratados com glicocorticoides durante o período pós-natal (entre P4 e P13), há uma alteração na formação dos septos secundários, o que faz com que o pulmão adulto apresente menor número de alvéolos, alvéolos mais alargados e menor superfície alveolar, efeito que persistiu na vida adulta (Massaro, 1985; Massaro, 1986).

Nos ratos tratados com dexametasona na fase em que ocorre a septação, não se formam septos, mesmo após o término do tratamento, não há septação espontânea (Massaro, 2000a). Massaro e colaboradores verificaram que a

dexametasona causa uma diminuição da espessura da parede alveolar, e no que diz respeito aos componentes da parede, há um menor volume de células tipo I, células intersticiais e matriz extracelular. Não houve diminuição na replicação das células endoteliais e as células tipo II também não foram afectadas, no entanto, diminuiu a taxa de conversão das células tipo II em tipo I (Massaro, 1986). Esta alteração no normal equilíbrio da divisão das células epiteliais e das células do estroma, essencial para a adequada septação, irá contribuir ou causar uma falha na septação dos sáculos (Massaro, 1986).

O **ácido retinóico e os seus receptores** estão envolvidos em quase todos os aspectos da diferenciação e maturação pulmonar (Chytil, 1992; Chytil, 1996). Na base desta consideração, está o facto da ausência de vitamina A na dieta alimentar, provocar uma metaplasia pavimentosa queratinizada da árvore broncopulmonar, o que pode ser revertido com o suplemento da mesma (Wolbach, 1925; Wolbach, 1933).

Ainda se sabe pouco acerca da aquisição e utilização dos retinóides armazenados, mas funcionalmente não há dúvidas que estão envolvidos na produção de surfactante (Metzler, 1993; Fraslon, 1994), na indução da formação dos septos alveolares (Massaro, 1996b; Massaro, 2000a; Massaro, 2000b), na diferenciação celular (Chytil, 1992; Costa, 2001; Bielsalski, 2003; Wongtrakool, 2003), na síntese e deposição de elastina (Lui, 1993; McGowan, 1995; Massaro, 1996a; McGowan, 1997a; McGowan, 1997b; McGowan, 2000), para além da capacidade de regeneração alveolar (Hind, 2004; Maden, 2006).

O papel do ácido retinóico (AR) na alveolização foi evidenciado pela primeira vez, por Massaro e colaboradores, num trabalho realizado com ratos, onde foi possível verificar que o ácido retinóico seria capaz de anular muitos dos efeitos inibidores dos glicocorticoides na alveolização (Massaro, 1996b). O AR, administrado nos ratos recém-nascidos, aumentava o número de alvéolos, diminuía a dimensão do alvéolo, e ao que parece, aumentava a superfície de trocas gasosas, permitindo concluir que os retinóides estão envolvidos na formação do septo (Massaro, 1996b).

Utilizando murganhos transgénicos com deleção do gene RAR- $\beta$ , o mesmo autor verificou que os pulmões destes animais apresentavam mais e menores alvéolos, mas que a superfície de trocas gasosas se mantinha igual à dos animais normais (Massaro, 2000a). Estes resultados podem ser explicados, se considerarmos que o ácido retinóico apenas induz a erupção do septo e regula a distância entre septos, não determinando o tamanho do alvéolo, o que deve ser

feito por outro agente regulador (Massaro, 2000a; Massaro, 2000b). Os retinóides influenciam as múltiplas funções celulares que estão envolvidas na formação do septo, tais como, a proliferação, migração e diferenciação celular (Chytil, 1996; Bielsalski, 2003).

Existem evidências de que o ácido retinóico aumenta a alveologénesese, ao regular a **transcrição da tropoelastina (TE)**, durante o final da vida fetal e o início da pós-natal (McGowan, 1997b). Regula a expressão do gene da elastina e a sua deposição, dois eventos importantes na alveolização pós-natal (McGowan, 1997b; McGowan, 2000).

De facto o ácido retinoico aumenta o RNAm da elastina, a tropoelastina e a elastina insolúvel (Lui, 1993). Os murganhos com deleção dos receptores RAR- $\gamma$  -/- RXR- $\alpha$  +/-, mostram um decréscimo na expressão do gene da elastina, o que na vida pós-natal causa uma diminuição do tecido elástico pulmonar, e uma redução do número de alvéolos (McGowan, 2000).

Vários estudos mostram o papel relevante da elastina septal na alveogénesese e, por conseguinte, os factores que modelarem a formação da elastina durante o desenvolvimento pulmonar também vão ter importância no processo da alveogénesese (Noguchi, 1989; Bostrom, 1996; Lindahl, 1997).

Os murganhos com deleção homocigótica do gene da elastina, que não sobrevivem após o dia de vida pós-natal P3,5, apresentaram uma alteração no desenvolvimento das vias condutoras distais, o que evidencia a participação essencial da elastina no processo de ramificação das vias condutoras terminais (Wendel, 2000).

Existem alguns trabalhos que ilustram a potencial utilidade dos retinóides na **diminuição da incidência de DBP** nos recém-nascidos (Shenai, 1987; Kennedy, 1997). Indirectamente o AR também pode reduzir a incidência de DBP, ao ser capaz de inibir o efeito dos glicocorticoides, frequentemente utilizados no tratamento desta patologia (Shenai, 1987; Kennedy, 1997).

No pulmão fetal do rato, o AR também interfere na **produção de surfactante**, ao aumentar a síntese dos fosfolípidos do surfactante (Fraslon, 1994) e ao regular a expressão dos genes das proteínas do surfactante (Metzler, 1993). De facto, o AR reduz a acumulação da SP-A e a expressão do seu RNAm, aumenta a expressão do RNAm da SP-B, sendo necessária uma concentração elevada de AR para reduzir o RNAm da SP-C (Metzler, 1993).

As hormonas sexuais, em especial **os estrogénios**, exercem efeitos reguladores durante o desenvolvimento pulmonar e na fisiologia e patologia do

pulmão. Afectam a inflamação dos espaços aéreos e a prevalência e severidade da maioria das doenças pulmonares, incluindo fibrose, asma e cancro pulmonar (Carey 2007).

Os estrogénios são requeridos para a formação e o total desenvolvimento do alvéolo (Massaro, 2004a; Massaro, 2006), para a manutenção dos alvéolos já formados, homeostase pulmonar (Patrone, 2003) e ainda para a indução da regeneração alveolar nos murganhos adultos (Massaro, 2004a; Massaro, 2007).

Há uma diferença ao nível da tradução do sinal dos estrogénios, caso se trate do desenvolvimento pulmonar ou da regeneração do pulmão, isto é, para que ocorra regeneração é necessário o receptor  $ER\alpha$ , e o  $ER\beta$  pouco ou nada interfere, enquanto que para o desenvolvimento completo dos alvéolos são necessários os dois receptores (Massaro, 2007).

Os estrogénios, por via  $ER\beta$ , também modificam a expressão do PDGF-A (factor de crescimento derivado das plaquetas), o que por sua vez altera a proliferação, migração e deposição de elastina, influenciando assim a alveologénese. Podem ainda alterar a expressão do GM-CSF (factor estimulante da colónia granulócitos-macrófagos), cuja acção influencia a homeostase do surfactante (Patrone, 2003).

A nível clínico é possível comprovar que os estrogénios são responsáveis pela manutenção alveolar e a sua perda na fase da menopausa (Massaro, 2007; Neas, 1996). Após três meses de terapia hormonal de substituição há um aumento no volume expiratório forçado (VEF) e na capacidade vital forçada (CVF), o que leva a pensar que os estrogénios têm efeitos modificadores na função pulmonar na mulher pós-menopausa (Pata, 2003).

A perda do efeito protector dos estrogénios é também visível no aumento da incidência de doenças pulmonares crónicas obstrutivas (DPCO), em mulheres não fumadoras na fase de menopausa, cuja incidência é duas vezes superior à dos homens (Ringbaek, 2005). A terapia com estrogénios mostrou alguns benefícios ao nível da incidência de doenças crónicas do pulmão, no entanto não se sabe se estes efeitos reflectem diferenças na formação de alvéolos (Trotter, 2001).

Estudos em murganhos adultos, revelaram que as **restrições calóricas** causam perda de alvéolos pulmonares e que a re-alimentação promove a regeneração alveolar, conseguindo aparentemente reverter as alterações desencadeadas pelo défice de alimentação (Massaro, 2002b; Massaro, 2004b). Após quinze dias de restrição calórica, os animais têm menos cerca de 55% dos

alvéolos, sendo que 32% são perdidos nas 72 horas iniciais e os restantes no decorrer da experiência (Massaro, 2002b; Massaro, 2004b). Observa-se que 72 horas após a re-alimentação, o número de alvéolos volta aos valores detectados inicialmente (Massaro, 2004b).

A perda de alvéolos deve-se à destruição das paredes alveolares (Massaro, 1996a) e ao que parece, a restrição calórica activa as células NK (“natural killers”) e os linfócitos citotóxicos (LCT), que desencadeiam a destruição alveolar, sendo a degradação da matriz extracelular o evento chave na apoptose da parede alveolar. A apoptose celular ocorre inicialmente pela acção das granzimas (proteases), libertadas pelas células NK e LCT. A granzima A não parece ter qualquer papel na apoptose, mas destrói as proteínas da matriz extracelular alterando o ambiente celular. Já a granzima B actua directamente, ao iniciar uma cascata intracelular que conduz á apoptose (Massaro, 2004b). No entanto, quer nos trabalhos com hamsters adultos (Karlinsky, 1986) ou com murganhos (Massaro, 2004b), não houve alteração da capacidade elástica de retracção do pulmão em resposta à restrição calórica.

A restrição calórica também pode induzir lesões pulmonares, facto que foi observado em ratos adultos, submetidos à fome (Sahebjami, 1981). As alterações morfológicas e ultraestruturais que estes animais apresentam, como alargamento dos espaços aéreos e ruptura da parede alveolar, são indistinguíveis das lesões observadas nos modelos de enfisema induzido (Sahebjami, 1981).

Um outro estudo realizado em pacientes com anorexia nervosa, também evidenciou alterações pulmonares do tipo do enfisema (Coxson, 2004). Há alargamento das unidades de trocas gasosas, com perda de tecido pulmonar, e à medida que aumenta a perda de massa corporal, observa-se uma menor capacidade de difusão (Coxson, 2004).

Em resumo, a subnutrição no adulto afecta as defesas pulmonares, a produção de surfactante, o controlo da respiração e a função muscular, assim como uma perda de elastina e de colagéneo o que provoca o aparecimento do enfisema pulmonar (Harding, 2004).

O interesse clínico no estudo dos **efeitos da hiperóxia**, deve-se precisamente, a alguns dos efeitos indesejáveis recorrentes do uso da ventilação assistida, sendo muito importante controlar variáveis, como o volume, a concentração e o tempo de exposição ao oxigénio. O volume ventilatório causa distensão e danos nas vias condutoras e nos alvéolos e o oxigénio produz vários metabolitos reactivos com elevada toxicidade, como superóxidos e peróxido de

hidrogénio, com capacidade para oxidar enzimas, inibir a síntese de proteínas e de ADN, diminuir a síntese de surfactante e causar a peroxidação dos lípidos (Clark, 2001).

A prolongada hiperóxia dá início a uma sequência de lesões que podem levar à inflamação, danos alveolares difusos, progressiva disfunção pulmonar, podendo até causar a morte (Clark, 2001).

No adulto a exposição a elevadas concentrações de oxigénio afecta principalmente o epitélio alveolar, para além de promover a proliferação das células septais, fibrose e edema septal. Contudo estes efeitos dependem da duração e da percentagem de oxigénio a que estiveram expostos (Gould, 1972).

Durante o período neonatal a hiperóxia afecta o desenvolvimento pulmonar, sendo o principal responsável pelo desenvolvimento da displasia broncopulmonar (DBP).

Os ratos submetidos a **hiperóxia** durante os primeiros sete dias de vida, apresentam espaços aéreos mais largos e menos alvéolos, o que demonstra que a hiperóxia inibe a alveolização, isto é, interfere com a septação e com outros processos de alveolização (Randel, 1989). No entanto, catorze dias após cessar a exposição, ocorre franca recuperação pulmonar, havendo completa reversão do processo (Randel, 1989).

Num trabalho posterior realizado com murganhos, também se observou uma diminuição do número de alvéolos, e conseqüentemente uma redução da área de trocas gasosas (McGrath-Morrow, 2001). Foi possível comprovar que quanto mais longo for o tempo de exposição à hiperóxia, maior será a taxa de mortalidade e a perda de peso corporal (McGrath-Morrow, 2001). A exposição a elevadas concentrações de oxigénio, induz um aumento da apoptose, sendo que o número de células em apoptose, aumenta com o tempo de exposição, o que na fase neonatal é crucial para a alveolização. Sem dúvida que o aumento, ainda que mínimo, das células em apoptose, irá interferir com o normal desenvolvimento pulmonar (McGrath-Morrow, 2001).

O interesse biomédico pela exposição a **baixos níveis de oxigénio (hipóxia)**, advém do facto de existirem populações que vivem a elevadas altitudes, sendo que esses habitantes apresentam algumas adaptações, como seja maior número e maiores dimensões dos alvéolos, e maior volume residual (Massaro, 1996a).

A hipoxia tem mais impacto nos animais em que a alveolização ocorre na vida pós-natal, do que nos animais com alveolização intra-uterina. Os animais

com alveolização intra-uterina, não ficam sujeitos às baixas concentrações de oxigénio, uma vez que as suas mães já desenvolveram mecanismos para suprir as necessidades de oxigénio do seu feto (Massaro, 1996a).

Quando os ratos gestantes foram submetidos a condições de hipoxia durante toda a gestação, os seus descendentes, por volta do 2º dia de vida pós-natal (P2), apresentaram sáculos maiores que as crias dos animais com gestação normal, havendo ainda uma diminuição da septação, e conseqüentemente dos alvéolos (Massaro, 2002a). Trabalhos posteriores, com fêmeas mantidas durante toda a gestação em condições de hipoxia, mostraram que os efeitos da hipoxia se mantêm por um período longo de tempo (Blanco, 1991; Massaro, 1996a).

A hipoxia também destrói as células endoteliais, alterando o desenvolvimento microvascular e interferindo com o normal processo de alveolização (Maniscalco, 1997). Quando no período neonatal os coelhos foram expostos a baixas concentrações de oxigénio, houve uma diminuição em cerca de 80% da abundância pulmonar de RNAm do VEGF e um decréscimo da expressão de VEGF nas células epiteliais alveolares (Maniscalco, 1997).

Também foi observado que a hipoxia afecta predominantemente a síntese de nova elastina (cerca de 70%) e inibe a normal reparação da elastina via enzima lisil oxidase (21%) (Berk, 2005). A hipoxia inibe a expressão do gene da elastina, e diminui a actividade ou reduz a expressão do RNAm da lisil oxidase (Berk, 2005).

O desenvolvimento do pulmão durante a vida fetal e infância, pode ser substancialmente afectado pelas **condições da vida intra-uterina** e pelo ambiente na vida pós-natal, podendo sofrer alterações funcionais ou até desenvolver certas patologias (Maritz, 2005).

**As restrições intra-uterinas**, dizem respeito às condições de nutrição e/ou oxigénio, que podem induzir alterações imediatas, ou a longo prazo, na estrutura e funcionamento do pulmão. Os factores que podem afectar este normal fornecimento incluem a insuficiência da placenta, devido a doenças vasculares da mãe (doença renal, diabetes, hipertensão crónica), patologias da placenta, hipoxia (devido a anemia e altas altitudes) e consumo de tabaco ou abuso de drogas (Harding, 2004).

Os fetos sujeitos a baixos níveis de nutrição e/ou oxigénio maternos apresentam restrição de crescimento intra-uterino (RCIU), nascendo com baixo peso para a idade gestacional. Os recém-nascidos com RCIU e os prematuros, apresentam frequentemente maior risco de insuficiência respiratória, sendo

necessário recorrer ao suporte respiratório, o que por sua vez aumenta o risco de desenvolvimento de displasia broncopulmonar (DBP) e o futuro aparecimento de outras patologias, como a asma ou doença obstrutiva crónica pulmonar (COPD) (Speer, 1998). As crianças que desenvolvem DBP apresentam pulmões com menos e maiores alvéolos, assim como uma menor superfície alveolar, o que evidencia uma alteração no processo de alveolização (Husain, 1998).

Durante a infância as crianças com RCIU, apresentam alterações a nível do fluxo expiratório, o que indica que as condições intra-uterinas são cruciais para o adequado desenvolvimento das vias condutoras pulmonares (Nikolajev, 1998).

Num trabalho realizado em cordeiros, foi possível verificar que os efeitos do RCIU no desenvolvimento pulmonar fetal, ocorrem nos últimos dias da gestação e nas primeiras oito semanas de vida, havendo espessamento das paredes alveolares, aumento da barreira alvéolo-capilar, menor capacidade de difusão pulmonar e edema e/ou maior deposição de matriz extracelular (Maritz, 2001). A adequada nutrição/oxigenação materna, é essencial para a normal estrutura alveolar, caso contrário o efeito poderá ser permanente, uma vez que diminui a eficiência nas trocas gasosas, e portanto afecta a saúde respiratória na vida adulta (Maritz, 2001).

A restrição do crescimento intra-uterino ainda está associado com uma redução nos movimentos respiratórios fetais (MRF), movimentos esses que têm um papel na manutenção do adequado grau de expansão pulmonar e no normal crescimento do pulmão (Hofhuis, 2003).

A **subnutrição fetal** altera a formação dos alvéolos, tornando-os maiores e aumentando a espessura da sua parede, reduz a elastina, diminui a produção de surfactante, uma vez que as células alveolares tipo II sofrem um atraso no processo de maturação celular, e ainda afecta os quatro sistemas de defesa pulmonar, a defesa antioxidante, a produção de surfactante, a secreção e transporte de muco e as competências imunológicas (Harding, 2004).

Outra causa de alterações pulmonares é o **parto prematuro (PP)**, que afecta 8% das crianças. Os PP com baixo tempo de gestação, podem deixar sequelas pulmonares sérias, devido à necessidade de ventilação assistida e à exposição a elevados níveis de oxigénio. As crianças de PP considerados de média gravidade, de acordo com o tempo de gestação, também podem sofrer consequências adversas, apesar de normalmente não ser necessário o recurso a ventilação assistida.

Nos últimos 40 anos a incidência de partos prematuros tem sofrido poucas alterações, sendo vários os factores que contribuem para o nascimento de crianças prematuras, nomeadamente as infecções maternas, o baixo nível socioeconómico, aumento da idade materna e o impacto de tratamentos de fertilidade (Albertine, 2004).

Sem dúvida que o nascimento prematuro provoca stress ambiental extremo ao recém-nascido, o que perturba o seu desenvolvimento pulmonar. A imaturidade estrutural e funcional do pulmão prematuro, implica a administração de esteroides, surfactante, suporte ventilatório, entre outros, a fim de minimizar os efeitos a longo prazo.

Com os avanços da medicina peri-natal houve um aumento da taxa de sobrevivência dos prematuros, mas um acréscimo considerável na morbidade e nas doenças crónicas respiratórias. Os pulmões dos prematuros são especialmente susceptíveis a lesões provocadas pela ventilação, isto porque há baixa concentração de surfactante, ainda não existe gás no pulmão e a capacidade funcional residual está ocupada com fluido (Jobe, 2000).

No início da vida pós-natal, outros factores podem provocar alterações permanentes na estrutura e função pulmonar, como por exemplo, a exposição ao fumo de tabaco e infecções respiratórias (Maritz, 2005).

Vários estudos epidemiológicos mostram que em cerca de 20-30% das crianças expostas **ao tabaco**, antes e/ou após o nascimento, há um aumento do risco de desenvolvimento de doenças respiratórias (Hofhuis, 2003).

A exposição ao tabaco durante a vida intra-uterina, causa mais danos no desenvolvimento pulmonar do que a exposição passiva na vida pós-natal. O tabaco induz complicações obstétricas, como por exemplo aborto espontâneo, gravidez ectópica e nascimentos prematuros e reduz os movimentos respiratórios fetais, o que causa hipoplasia dos pulmões fetais (Hofhuis, 2003). Outro efeito é a redução do peso à nascença, como resultado da alteração morfológica da placenta, o que reduz a disponibilidade de oxigénio fetal e expõe o feto a hipoxia crónica (Hofhuis, 2003).

Apesar de o tabaco conter um vasto número de componentes, a nicotina é sem dúvida o principal responsável pelas consequências adversas na saúde, uma vez que atravessa facilmente a placenta, chegando a atingir concentrações mais elevadas na circulação fetal do que na mãe, pois a sua eliminação no sangue fetal é mais lenta. O feto fica exposto à nicotina que circula no seu sangue (através da placenta), mas também à que se acumula no líquido amniótico, sendo

rapidamente absorvida pela pele fetal que é permeável ao líquido amniótico. Quanto maior for a concentração de nicotina, e menor for a sua eliminação, maior será o seu efeito (Maritz, 2005).

Um estudo experimental com ratos, mostrou claramente que a exposição à nicotina durante a gestação e a lactação, interfere com a saúde pulmonar dos recém-nascidos (Maritz, 2002). Ao dia de vida pós-natal P14 houve uma redução do número de alvéolos e durante os dias P14 e P21, altura em que ocorre o maior acréscimo de alvéolos, o aumento foi bem menor que o normal, determinando uma redução da área de trocas gasosas pulmonares (Maritz, 2002).

A exposição à nicotina, durante a gestação e a lactação, altera os genes responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da integridade pulmonar, o que faz com que a criança fique mais susceptível ao aparecimento de certas doenças, como por exemplo o enfisema pulmonar (Maritz, 2002).

As infecções intra-uterinas são a causa mais comum para os nascimentos prematuros, tendo sido associadas ao desenvolvimento de doenças crónicas pulmonares nos recém-nascidos, mas ao que parece, também podem influenciar o desenvolvimento pulmonar (Lyon, 2000). O aumento das citocinas inflamatórias no fluido amniótico, inicia uma série de eventos que resultam na maturação precoce do pulmão, o que reduz o risco de desenvolvimento de doença respiratória aguda, mas aumenta o risco de doença crónica (Lyon, 2000).

Outros trabalhos corroboram a ideia de que a **inflamação** pode promover a maturação precoce do pulmão, mas que pode causar danos pulmonares e nascimentos prematuros (Jobe, 2001; Speer, 1999). O estudo da resposta inflamatória permitiu observar, que no pulmão dos murganhos, existe elevada expressão de TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$  e IL6, factores que interferem com a alveolização (Jobe, 2001).

Além disso, em quase todos os processos inflamatórios há activação das metaloproteínas da matriz (MMP), o que pode provocar a destruição dos componentes da matriz, e portanto alterar a estrutura e função pulmonar (Parks, 2001). A MMP-12, uma das proteínas activadas durante o processo inflamatório, já mostrou ser uma potente elastase, podendo ser a responsável pela destruição da elastina, e assim alterar a capacidade elástica pulmonar (Parks, 2001).

De facto, a inflamação está ligada à destruição dos alvéolos, pois no pulmão adulto com doença obstrutiva crónica, onde os níveis de citocinas, neutrófilos e macrófagos estão elevados, há destruição dos alvéolos (Chung, 2001).

**Em suma**, podemos dizer que a formação e/ou destruição dos alvéolos está sujeita a numerosos estímulos fisiológicos, nos quais se incluem nutrição, oxigenação, nível hormonal, alguns factores de crescimento como VEGF, PDGF-A, neuropilinas e ácido retinóico. Apesar da sua reconhecida acção ainda não existem terapias clinicamente comprovadas, para aumentar a formação de alvéolos nos recém-nascidos ou no pulmão adulto.

### **1.3. Estrutura da parede alveolar**

O **epitélio alveolar** apresenta-se formado pelos **pneumócitos tipo I**, responsáveis pelas trocas gasosas, e pelos **pneumócitos tipo II** que produzem surfactante pulmonar, detoxificam e actuam como células de reserva.

Os pneumócitos tipo I não tem capacidade de divisão, sendo portanto considerados por alguns cientistas como células completamente diferenciadas, e em caso de lesão, serão as células tipo II que se vão dividir e recobrir as áreas lesadas, reaparecendo posteriormente células tipo I (Gould, 1972; Adamson, 1975). De facto em cultura, as células tipo II mantêm as suas características fenotípicas, no entanto, quando submetidas a condições físico-químicas específicas, adquirem o fenótipo típico das células tipo I (Reynolds, 1999).

Os **pneumócitos tipo I** fazem parte da barreira ar-sangue e dispõem-se na parede alveolar junto aos capilares, ocupando 90% da área respiratória. São células pavimentosas, com núcleo achatado e basal e citoplasma delgado. Existem poucos marcadores que permitem a sua identificação, no entanto algumas lectinas específicas (McGowan, 2004b) e algumas proteínas, como por exemplo a T1- $\alpha$  (Williams, 1996; Borok, 1998), possibilitam a sua detecção.

A proteína da membrana plasmática T1- $\alpha$  é o marcador mais conhecido, estando expressa no pulmão adulto apenas nas células tipo I (Williams, 1996). Durante a fase inicial do desenvolvimento pulmonar do rato, a T1- $\alpha$  está expressa por todo o pulmão, mas à medida que a gestação avança, a sua expressão fica restrita às regiões distais, futuras áreas alveolares (Williams, 1996). Ainda está presente nas células epiteliais do plexo coróide e do corpo ciliar, o que permite considerar que esta proteína esteja envolvida no transporte ou na regulação do transporte de fluidos (Williams, 1996).

Outra classe de proteínas também expressa pelos pneumócitos tipo I, são as aquaporinas (AQP) (Verkman, 2000; Kreda, 2001; Sato, 2004). São proteínas integrais que funcionam como canais moleculares de água, e até à data, foram

identificadas nos mamíferos dez aquaporinas (AQPs 0-9), que se distribuem por diferentes tecidos, mas que de uma forma geral se localizam em zonas onde há rápido transporte de fluído. Para além do transporte de água, algumas podem transportar glicerol e ureia, caso da AQP3 e AQP7, ou até transportar pequenos solutos polares, exemplo da AQP 9 (Verkman, 2000). No pulmão do homem foram detectadas as AQP3, AQP4 e AQP5, com diferente distribuição celular. Na região alveolar, a AQP3 encontra-se expressa nas células tipo II e ainda nas passagens aéreas, a AQP 5 apenas nas células tipo I, enquanto a AQP4 se encontra difusamente distribuída pelas várias células alveolares (Kreda, 2001; Sato, 2004). As aquaporinas tem um papel importante na fisiologia pulmonar, no entanto não interferem na limpeza/acumulação de fluído pulmonar (Verkman, 2000).

A molécula de adesão intercelular (ICAM-1), uma proteína que está envolvida numa variedade de interacções imunes e inflamatórias, também está expressa no pulmão adulto saudável, e apenas nos pneumócitos tipo I (Attar, 1999). O elevado nível de expressão de ICAM-1 no pulmão adulto, tem um papel importante na determinação da resposta inflamatória no espaço alveolar. No pulmão imaturo das crianças, a falta de ICAM-1 pode contribuir para aumentar a susceptibilidade do desenvolvimento de pneumonia, ou para aumentar o risco de fibrose após lesão (Attar, 1999). No rato, até ao dia de gestação E18, o nível de ICAM-1 é baixo, mas a partir deste dia, aumenta progressivamente à medida que aumenta a área de superfície pulmonar e que prossegue a diferenciação celular alveolar (Attar, 1999).

**Os pneumócitos tipo II** localizam-se frequentemente nos cantos dos alvéolos, ocupando cerca de 10% da superfície alveolar, e têm como funções produzir surfactante, destoxificar e actuar como células de reserva. Começam a sua diferenciação no homem, no início da 24<sup>a</sup> semana de gestação, e no murganho ao dia de gestação E18 (Costa, 2001). Quando começam a sintetizar os fosfolípidos do surfactante, sofrem várias alterações morfológicas, nomeadamente a perda de grandes quantidades de glicogénio, que se considera ser degradado para prover o substrato metabólico necessário para despoletar o início da síntese dos fosfolípidos (McGowan, 2004b).

São células poligonais, com microvilosidades, um citoplasma denso e com numerosos corpos lamelares. Os corpos lamelares, que são acumulações intracelulares de surfactante, são formados por uma bicamada lipídica altamente arrumada em camadas concêntricas e pelas proteínas surfactantes SP-A, SP-B,

SP-C e SP-D (Weaver, 2001; Rooney, 1994). Por exocitose, os pneumócitos libertam o conteúdo dos seus corpos lamelares para a zona que delimita o alvéolo. A passagem da forma armazenada para a de uma película superficial funcional, envolve o desenrolar das lamelas e a adsorção dos lípidos, para formar uma película interfacial ar-líquido (Weaver, 2001). Esta transformação estrutural, forma a denominada mielina tubular, um surfactante intermédio que se pensa dar origem à monocamada de surfactante que limita a superfície alveolar (McGowan, 2004b).

O **surfactante pulmonar** tem como principal função, manter a baixa tensão superficial na interface ar-líquido, e prevenir o colapso alveolar durante a expiração (Frerking, 2001). São ainda reconhecidas outras funções, como manter a estabilidade da película, auxiliar o transporte mucociliar e actividade antioxidante (Frerking, 2001) e participar no mecanismo de defesa, e na imunidade pulmonar (Crouch, 2001; Frerking, 2001).

O surfactante é formado por fosfolípidos (80%) (Rooney, 1994), colesterol (Orgeig, 2001), triacilglicerol, ácidos gordos livres (Wagle, 1999) (8%) e proteínas (12%) (Frerking, 2001). As proteínas do surfactante SP-B e SP-C promovem a adsorção dos fosfolípidos do surfactante à interface ar-líquido, e causam a rápida redução na tensão superficial (Rooney, 1994; Weaver, 2001). As proteínas SP-A e SP-D, participam na resposta imune inata a microrganismos patogénicos e alergénicos orgânicos, e também podem modelar a função das células fagocíticas, interagir especificamente com os leucócitos, interagir com poluentes e contribuir para a regulação da homeostase do surfactante (Crouch, 2001; Lawson, 2000; Hawgood, 2002).

Quando a película perde funcionalidade, a maior parte do surfactante é removido pelos pneumócitos tipo II, por endocitose, onde alguns dos seus componentes são reciclados e outros são degradados (Weaver, 2001; Rooney, 1994).

As principais **células do interstício alveolar** são os **fibroblastos intersticiais**, responsáveis pela produção da maioria dos componentes da matriz e pelo fornecimento de substrato metabólico para o epitélio. Ainda estão presentes macrófagos alveolares, células com origem nos monócitos e com função fagocitária, e mastócitos.

Durante o processo de alveolização, os fibroblastos intersticiais passam por diferentes fases, as quais incluem proliferação, migração, síntese dos componentes da matriz e apoptose. De acordo com a presença ou ausência de

gotículas lipídicas citoplasmáticas, os fibroblastos podem ser diferenciados em duas populações, a de células intersticiais lipídicas (LICs) e a de células intersticiais não lipídicas (NLICs) (Vaccaro, 1978; Brody, 1983). Os LICs apresentam poucos organelos, abundantes gotículas lipídicas, elevado conteúdo em glicogénio e localizam-se na base do septo alveolar, enquanto os **NLICs**, não tem gotículas lipídicas e dispõem-se no topo dos septos alveolares (Vaccaro, 1978; McGowan, 2004). Para além das gotículas lipídicas os LICs apresentam outras características que são comuns aos adipócitos, como sejam, serem células mesenquimatosas, estarem ausentes até à fase final da gestação e aumentarem marcadamente logo após o nascimento. Ainda expressam determinados genes que são específicos dos adipócitos, como é o caso da lipase lipoproteica (LLP), do transportador de ácidos gordos (FAT), da proteína ligante dos lípidos nos adipócitos (ALBP) e da hormona sensível à lipase (HSL), envolvidos nos processos de captação e transporte de ácidos gordos e na acumulação e hidrólise de triglicerídeos. Os genes LLP, ALBP e FAT atingem o seu pico de expressão na vida pós-natal, o que coincide com a máxima acumulação de triglicerídeos nos LICs, e permite considerar que participam na acumulação de triglicerídeos e no metabolismo dos LICs (Chen, 1998a).

Os LICs também expressam receptores de lípidos de baixa densidade (LDL) e de lípidos de muito baixa densidade (VLDL), mas apenas o receptor LDL aumenta a sua expressão na vida pós natal (McGowan, 2001). Também acumulam esteres de retinilo (McGowan, 1995), em especial no período pós-natal o que certamente está relacionado com o processo de alveolização e a participação destas células durante esta fase de desenvolvimento pulmonar (Bairos, 1986).

Em cultura, os triglicerídeos dos fibroblastos são usados para a síntese dos fosfolípidos do surfactante, existindo mobilização dos triglicerídeos dos LICs para as células tipo II (McGowan, 1997a). O mecanismo de transferência dos lípidos neutros dos LICs para as células tipo II ainda não foi devidamente estabelecido, mas pensa-se que a lipase presente nos LICs, faça a de-esterificação dos lípidos antes da exportação como ácidos gordos (Chen, 1998a). Também é possível que as gotículas lipídicas sejam transferidas directamente de uma célula para outra, pois no pulmão neonatal de rato, foram observadas comunicações intercelulares entre os LICs e as células tipo II (Grant, 1983).

Ambos os fibroblastos apresentam filamentos contrácteis, semelhantes aos observados nos miofibroblastos, no entanto nos LICs, os filamentos contrácteis

são mais densos e os seus eixos estão orientados na perpendicular ou oblíquos à membrana plasmática. Ainda de referir que a densidade intracelular dos filamentos contrácteis, é maior na zona onde ambos os fibroblastos (LICs e NLICs) contactam com as fibras de colagénio e as fibras elásticas (Adler, 1989).

Os fibroblastos intersticiais produzem a maioria das proteínas, entre as quais se destacam a elastina, proteína que confere elasticidade e capacidade de retracção pulmonar, o colagénio que confere força tênsil á parede alveolar, os proteoglicanos que proporcionam um ambiente hidratado e os glicosaminoglicanos que conferem consistência á parede.

A **matriz extracelular** tem um papel complexo na regulação do contacto que se estabelece com as células, influenciando o seu desenvolvimento, migração, proliferação e morfologia, para além de funções metabólicas (Wright, 1999). A membrana basal, que serve de interface entre o epitélio e o mesênquima envolvente, também apresenta importância relevante, ao participar como mediador na interacção entre estes dois tecidos.

Faremos uma breve abordagem dos principais componentes da matriz extracelular, que fazem interface epitélio-mesênquima e que são fundamentais para o desenvolvimento pulmonar.

O colagénio é o principal constituinte da matriz extracelular, que para além do papel estrutural, também pode ter funções fisiológicas e participar no processo de ramificação pulmonar. No pulmão adulto, o colagénio constitui 60% do conteúdo proteico do tecido conjuntivo e apesar de existirem pelo menos 15 tipos de colagénio, nem todos estão presentes no pulmão. O colagénio tipo I e tipo III estão associados ao tecido conjuntivo mesenquimatoso, o tipo IV está principalmente na membrana basal e o tipo V junto da membrana basal mas associado com a matriz intersticial (Keyzer, 1999).

A nível pulmonar o colagénio I está distribuído por toda a matriz extracelular, com excepção da membrana basal, apresentando uma forte marcação no tecido conjuntivo que envolve os vasos e as vias aéreas. O colagénio III apresenta a mesma distribuição, mas ao contrário do tipo I, acumula-se nas fendas e nas cristas secundárias. O colagénio IV não se encontra apenas confinado à membrana basal do epitélio e vasos, mas também está nas fendas e cristas secundárias (Wright, 1999).

Durante o desenvolvimento pulmonar os colagénios III e IV têm expressão em locais de ramificação e de formação de cristas, o que evidencia o seu papel na iniciação e estabilização das ramificações pulmonares (Wright, 1999).

As **lamininas (Lam)**, glicoproteínas da membrana basal, são heterotrímeros compostos por 3 cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) ligadas entre si por ligações dissulfídicas, que têm um papel importante na adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Schuger, 1997; Nguyen, 2006). Também possuem a capacidade de se auto-polimerizar e ligar a outras proteínas da membrana basal, como colagénio IV, nidogena (entactina), e de se ligar aos receptores celulares (integrinas e não integrinas) (Schuger, 1997; Keyzer, 1999; Nguyen, 2006).

A nível pulmonar as lamininas têm um papel importante na interacção epitélio-mesênquima, participando na ramificação pulmonar (Keyzer, 1999; Schuger, 1997) e promovendo a proliferação das células epiteliais (Schuger, 1997), o que contribui para a arquitectura pulmonar (Warburton, 1999; Nguyen, 2006). A Lam1 está presente em todas as fases do desenvolvimento pulmonar. Na fase pseudoglandular as Lam1 e Lam2 localizam-se nos botões epiteliais, enquanto a Lam3 está nos túbulos e a Lam5 por todo o epitélio. Com o avançar da gestação a Lam2 desaparece, e nos brônquios em vez da Lam3 passamos a detectar Lam1 (Keyzer, 1999).

A **fibronectina**, é uma glicoproteína da matriz, que *in vitro* tem a capacidade de afectar a migração, proliferação, diferenciação e até a apoptose de vários tipos de células, todas elas necessárias à organogénese (Roman, 1997). O pico e distribuição da fibronectina, permite afirmar que esta proteína tem um papel importante na ramificação pulmonar (Roman, 1997) e que participa no processo de vascularização pulmonar (George, 1993; Roman, 1997) e na diferenciação das células alveolares (Roman, 1997).

Os **proteoglicanos** são proteínas extracelulares que se ligam aos glicosaminoglicanos, conferindo à matriz uma característica hidratada e uma certa rigidez, o que permite resistir à compressão. Alguns proteoglicanos ainda podem estar ancorados na membrana, podendo assim ligar-se a factores de crescimento ou a outras proteínas. Também podem formar géis que actuam como um filtro que regula a passagem de moléculas entre o meio extracelular e podendo também bloquear, activar ou guiar a migração celular através da matriz (Iozzo, 1996). Se ocorrer inibição da síntese de proteoglicanos, não se formam sacos alveolares (Hilfer, 1996).

As **fibras elásticas** são um dos componentes principais da matriz e muito importantes para a funcionalidade e estrutura pulmonar. Fornecem elasticidade e resiliência aos órgãos que necessitam de se distender e reverter esse processo repetidamente, como é o caso dos pulmões.

Ultraestruturalmente as fibras são complexas, sendo compostas por dois componentes principais: o componente amorfo, constituído exclusivamente pela proteína elastina (90%), e o componente microfibrilar, que se dispõe à periferia do componente amorfo e no seu interstício, conferindo suporte estrutural (Ross, 1969; Ross, 1973). A componente microfibrilar tem uma composição heterogénea, tendo sido identificadas duas isoformas da glicoproteína fibrilina (fibrilina 1 e 2), e duas glicoproteínas associadas às microfibrilhas (MAGP) (MAGP1 e 2) (Gibson, 1989; Gibson, 1996).

Ainda estão presentes a lisil oxidase, a proteína ligante da elastina (EBP), proteoglicanos, osteopontina, emilinas, fibulinas e várias outras proteínas associadas às microfibrilhas (Vrhovski, 1998; Mariani, 1999).

A **elastina** madura é uma das substâncias mais resistentes, sendo estável em condições extremas de temperatura e pH. É uma proteína insolúvel, devido às extensas ligações cruzadas existentes entre os resíduos de lisina, sendo difícil a sua purificação, uma vez que tem tendência para calcificar (Daamen, 2001). A expressão da elastina é controlada por vários factores como o ácido retinóico (McGowan, 1997b; McGowan 2000; Lui, 1993; Massaro, 1996a; McGowan, 1997a), glicocorticoides (Pierce, 1995) e TGF- $\beta$  (McGowan, 1992).

O gene humano da elastina encontra-se no cromossoma 7 e codifica a proteína tropoelastina (TE), que é o precursor solúvel da elastina. O gene tem 36 exões, separados entre si por intrões, na proporção de 1:20 (exão/intrão), o que indica que pequenos exões são intercalados com grandes intrões e que uma quantidade relativamente grande da sequência, é removida durante o processamento do RNA (Bashir, 1990; Mariani, 1999). Este facto justifica a variabilidade observada na tropoelastina, existindo várias isoformas resultantes do “splicing” alternativo (Debelle, 1999), no entanto é uma proteína muito conservada entre as várias espécies (Mariani, 1999).

Outra característica deste gene, é o facto de as sequências hidrofóbicas e hidrofílicas da TE serem codificadas em diferentes exões, que alternam uns com os outros ao longo do gene (Bashir, 1990). Este padrão é conservado entre as espécies, mas de acordo com a espécie certos exões podem estar ausentes ou podem existir exões específicos dessa espécie, como por exemplo o exão 26A, que é específico do gene humano (Vrhovski, 1998; Debelle, 1999; Jensen, 2000). Ambos os domínios hidrofóbico e hidrofílico da tropoelastina, podem ser afectados pelo “splicing” alternativo e, como tal, surgem isoformas da TE, que

podem apresentar características conformacionais e mecânicas ligeiramente diferentes (Bashir, 1990).

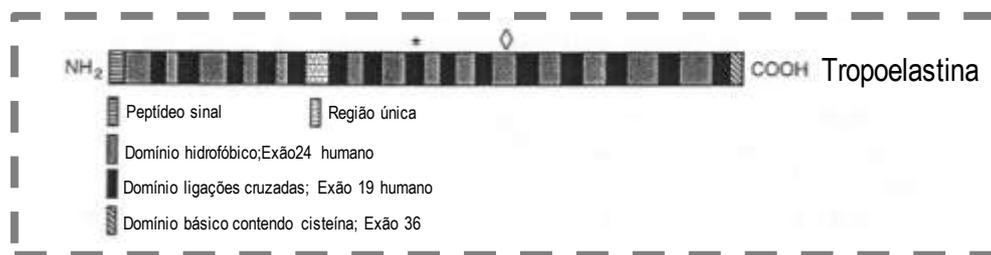
A **tropoelastina**, o precursor solúvel da elastina, é uma molécula com 70 KDa de massa molecular relativa e cerca de 728 a 768 resíduos de aminoácidos, de acordo com a espécie e o tipo de tecido estudado (Sandberg, 1990; Mariani, 1999).

A análise da sua composição revela que é uma proteína com forte carácter hidrofóbico, com cerca de 93% de resíduos apolares (Sandberg, 1990), que apresenta vários domínios principais, o hidrofóbico, o das ligações cruzadas e a sequência terminal carboxílica (Vrhovski, 1998) (Fig.4).

O **domínio hidrofóbico** é rico em aminoácidos não polares, como a glicina (Gli), valina (Val), prolina (Pro), alanina (Ala), leucina (L) e isoleucina (I), sendo a Gli e a Val os mais abundantes (Vrhovski, 1998).

O domínio **das ligações cruzadas** é constituído por peptídeos hidrófilos, contendo resíduos de lisina numa região rica em prolina ou em alanina (Debelle, 1999).

A **sequência terminal carboxílica** ou domínio C-terminal, é uma sequência de 26 aminoácidos, fortemente alcalina e hidrofílica, que possui os dois únicos resíduos de cisteína existentes na molécula de TE (Vrhovski, 1998; Debelle, 1999). É codificada pelo exão 36, sendo a região mais conservada nas diferentes espécies estudadas (Vrhovski, 1998; Debelle, 1999), uma vez que a sua ausência ou alteração da sua posição na molécula, produz tropoelastina incapaz de se ordenar e estabelecer ligações cruzadas, fundamental na formação das fibras elásticas (Jensen, 2000).



**Figura 4.** Estrutura da tropoelastina (adaptado de Mariani, 1999).

A **tropoelastina (TE)** é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (RER), passando depois para o complexo de Golgi, onde é encerrada em vesículas de secreção, que são excretadas por exocitose (Davis, 1998a; Vrhovski, 1998). Ao contrário da maioria das proteínas da matriz extracelular, sofre poucas modificações pós-translacionais e não evidencia glicosilação, não se observando

proteólise ou polimerização das cadeias de TE recém sintetizadas (Vrhovski, 1998). Apenas ocorre hidroxilação do resíduo prolina, por acção da enzima prolil-hidrolase, o que apenas acontece a 0-20% destes resíduos (Vrhovski, 1998).

Em condições fisiológicas, os monómeros de TE agregam-se espontaneamente por um processo denominado de coacervação (Vrhovski, 1998). Para evitar a aglomeração no interior da célula e impedir a excreção de cadeias livres de TE, existe um complexo de proteínas “chaperons”, que inibe a coacervação intracelular (Davis, 1998a). Em condições anormais, existe uma via proteolítica que actua caso ocorra acumulação de TE no lúmen do RER (Davis, 1998a; Davis, 1996). A enzima protease cisteínica é a responsável pela destruição de elevadas quantidades de TE, podendo actuar na degradação de formas anormais ou defeituosas da molécula, fazendo assim um “controlo de qualidade” da produção da TE (Davis, 1996).

A primeira das moléculas “chaperons” a intervir é uma proteína pertencente ao grupo BiP (“heavy-chain binding protein”), que se liga á TE no lúmen do RER logo que se inicia a síntese da proteína, promovendo o correcto enrolamento e dobragem da cadeia polipeptídica (Davis, 1998a; Davis, 1998b).

Com uma acção mais exclusiva actuam outras duas moléculas, a proteína de ligação FK65 (FKBP65) (Davis, 1998b) e a proteína de ligação a elastina - 67Kda (EBP-67), cujo único substrato é a tropoelastina.

A FKBP65 é uma proteína do grupo de receptores intracelulares das imunofilinas, que se encontra no lúmen do retículo endoplasmático e que actua no enrolamento e conformação da TE, intervém na regulação do tráfego desta molécula ao longo da via metabólica, impedindo a sua acumulação no lúmen do RER e direccionando-a para o complexo de Golgi (Patterson, 2000). É, portanto, uma molécula “chaperone” que evita a agregação da TE antes do transporte do RER para o Golgi (Patterson, 2000).

A proteína EBP-67 parece actuar como molécula “chaperone” ao proteger a TE da degradação proteolítica intracelular e da agregação prematura (Vrhovski, 1998; Hinek, 1994). Transporta a TE através da via secretora, e permite a deposição desta na superfície extracelular, sendo depois reciclada para o compartimento intracelular onde se volta a associar à TE recém formada (Hinek, 1995). A reciclagem da EBP-67 é um processo imperativo para a adequada secreção e deposição da TE e conseqüentemente para a associação das fibras elásticas (Hinek, 1995; Vrhovski, 1998; Debelle, 1999).

A EBP-67 é uma forma de “splicing” da  $\beta$ -galactosidase (Privitera 1998) que perdeu a capacidade catalítica, manteve a capacidade de ligar galactoaçúcares e que adquiriu uma sequência que lhe permite ligar-se à elastina e laminina (Privitera 1998; Hinek, 1993). Têm três locais de ligação distintos, um para a TE, outro para a membrana celular e um domínio com propriedades de lectina (açúcares) (Mecham, 1989; Mecham, 1991; Hinek, 1988).

O complexo TE/EBP-67 é segregado até à superfície celular e as microfibrilhas glicosiladas interagem com a EBP no local da ligação da lectina, libertando a TE na superfície da microfibrilha (Vrhovski, 1998; Debelle, 1999). Ao que sabemos, a ligação do  $\beta$ -galactoaçúcar no domínio da lectina causa uma alteração conformacional na proteína EBP-67, libertando a TE e separando-se da âncora (Hinek, 1993), isto é, das outras subunidades do receptor, as proteínas da membrana celular com 61Kda e 55 Kda (Mecham, 1989).

Após a síntese, transporte, secreção e deposição dos monómeros de TE, ocorre o alinhamento e formação das ligações cruzadas, etapa em que as microfibrilhas participam e que é fundamental para a formação da elastina insolúvel (Ross, 1969).

As **microfibrilhas** têm vários papéis, entre os quais se incluem o de molde que guia a deposição da elastina e associação das fibras elásticas, o de conexão dos diferentes componentes da matriz e de prevenção do alongamento excessivo das fibras (Rosenbloom, 1993).

Durante o processo de elastogénese verifica-se que o componente microfibrilhar é sintetizado antes da formação da elastina, organizando-se próximo da célula e formando uma espécie de molde que coordena a polimerização da elastina e orientando a organização tridimensional das fibras elásticas (Ross, 1973).

O estudo dos componentes das microfibrilhas é difícil devido à sua constituição química, muito semelhante à de vários compostos da matriz, e devido às suas pequenas dimensões e à sua insolubilidade (Ross, 1973). Além disso, as múltiplas ligações que estabelecem, quer entre si, quer com a elastina ou com outros elementos da matriz e com a própria membrana celular, tornam difícil o seu isolamento, purificação e identificação (Robert, 1971; Fanning, 1985).

Os **principais componentes das microfibrilhas** são as fibrilina-1, fibrilina-2, MAGP 1 e MAGP 2, para além da lisil oxidase e das proteínas associadas às microfibrilhas (Gibson, 1996; Sakai, 1986).

A **fibrilina**, identificada por Sakai e colaboradores, foi descrita como uma glicoproteína acídica com 350 KDa de massa molecular e com elevado teor em resíduos de cisteína (Sakai, 1986). Os genes que codificam as fibrilinas humanas encontram-se nos cromossomas 15 (gene FBN1) e 5 (gene FBN2) que codificam a Fib-15 e Fib-5 respectivamente, também denominadas como fibrilina-1 (Fib-1) e fibrilina-2 (Fib-2) (Zhang, 1994), com elevado grau de homologia (Trask, 2000). A principal diferença estrutural entre as duas fibrilinas localiza-se no terminal amino (fig. 5). Na Fib-1 esta região é rica em prolina, enquanto na Fib-2 esta é rica em glicina (Zhang, 1995; Zhang, 1994; Handford, 2000). Esta diferença tem grandes implicações, pois a sequência rica em prolina da Fib-1 está associada à agregação e polimerização dos monómeros de TE, favorecendo uma função mecano-estrutural, enquanto a região rica em glicina da Fib-2 mostra grande homologia com algumas sequências da elastina, associando-se a esta molécula no início da elastogénese (Zhang, 1995; Zhang, 1994).

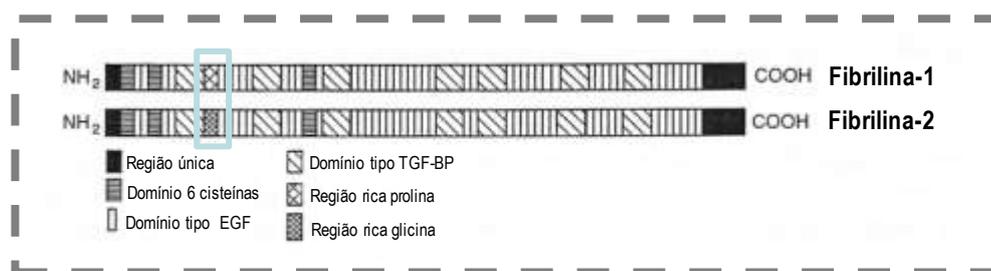


Figura 5. Estrutura das fibrilinas 1 e 2 (adaptado de Mariani, 1999).

Ao longo do desenvolvimento pulmonar a Fib-1 e a Fib-2 têm diferente expressão (Zhang, 1995). A Fib-2 foi detectada mais cedo que a Fib-1 e a sua expressão declina à medida que a Fib-1 começa a ser mais proeminente, o que acontece numa fase mais tardia do desenvolvimento pulmonar (Mariani, 1997). Na fase pré-natal observa-se principalmente Fib-2, enquanto na pós-natal predomina a Fib-1, o que permite supor que a Fib-2 regula a associação das fibras elásticas e a Fib-1 fornece suporte estrutural (Zhang, 1995).

Ao ligarem a tropoelastina, as fibrilinas facilitam o alinhamento das cadeias de TE, permitindo a eficiente ligação cruzada entre as moléculas, contribuindo assim para a organização da matriz elástica (Trask, 2000).

De facto, a mutação espontânea no gene da Fib-1 (Siracusa, 1996; Siracusa, 1998) observada em animais laboratoriais, denominados de murganhos de pele "Tight" (Tsk) (Green, 1976), mostra que a produção de uma fibrilina mutada é responsável pela falha do processo de formação de fibras elásticas e

por essa razão, os níveis de elastina no parênquima pulmonar são reduzidos (Kielty, 1998). Ao dia de vida pós-natal P30 os pulmões apresentam um menor número de alvéolos, cujas dimensões são superiores ao normal. (Green, 1976; Siracusa, 1998).

As **glicoproteínas associadas às microfibrilhas (MAGPs)** fazem parte do componente microfibrilar, tendo sido identificadas dois tipos desta glicoproteína, a MAGP-1, com 31KDa de massa molecular e com locus no cromossoma 1 e a MAGP-2 com 25KDa e locus no cromossoma 12 (Gibson, 1996).

A MAGP-1 é hidrofílica, ácida e com duas porções distintas química e estruturalmente: numa metade da molécula está a sequência associada à região terminal amino (N-terminal), hidrofílica e rica em glutamina e prolina, e na outra metade a região carboxílica, com carácter hidrofóbico, que contém 13 resíduos de cisteína e aminoácidos básicos (Bashir, 1994). A região N-terminal possui o local de ligação ao colagénio tipo VI, um local sem cisteínas, que também é o local de ligação à TE, no entanto tem maior afinidade para a TE do que para o colagénio, o que indica que a função desta glicoproteína é sobretudo orientada para a elastogénese (Finnis, 1997). A ligação entre a MAGP-1 e a TE ocorre entre o C-terminal da TE e a metade do N-terminal da MAGP-1, passo importante na fibrilogénese.

A região carboxílica da molécula MAGP-1 possui uma sequência de 54 aminoácidos que são responsáveis pela sua ligação à matriz extracelular e a sua capacidade de ligação está dependente da presença de sete resíduos de cisteína nesta sequência (Segade, 2002).

A MAGP-2 contém uma sequência similar ao domínio de ligação à matriz extracelular da MAGP-1, mas não se consegue ligar à matriz devido à simples alteração de um único aminoácido. A substituição de uma cisteína por uma valina, é responsável pela perda de capacidade de ligação da MAGP-2 (Segade, 2002).

A semelhança entre as duas proteínas está confinada a uma região central de 60 aminoácidos onde há um alinhamento preciso de sete resíduos de cisteína. A MAGP-2 é rica em resíduos de serina e treonina, mas não têm as sequências ricas em prolina, glutamina e tirosina, não apresentando o terminal carboxílico hidrofóbico característico da MAGP-1 (Gibson, 1996). Possui domínios importantes, inexistentes na MAGP1, nomeadamente uma sequência de consenso que permite a N-glicosilação e uma sequência RGD, localizada na região onde a MAGP-1 possui o local de ligação à TE, diferença estrutural essa, que sugere que a MAGP-2 tem uma função distinta da MAGP-1 (Gibson, 1996).

As **fibulinas** (Fibu) são uma família de glicoproteínas ligantes do cálcio, presentes na matriz extracelular e que surgem associadas a várias estruturas, como fibras elásticas, diversos elementos da membrana basal e constituintes do coágulo sanguíneo. Este carácter ubíquo deve-se ao facto das fibulinas se ligarem a uma grande variedade de compostos, nos quais se incluem a fibronectina, lamininas, elastina, fibrilina, nidogénio, perlecano e fibrinogénio (Olin, 2001).

São constituídas por uma longa cadeia polipeptídica, rica em cisteína, que representa cerca de 11% do número de resíduos da molécula (Argraves, 1990). A fibulina-1 (Fibu-1) e a fibulina-2 (Fibu-2) têm dois domínios globulares, o domínio terminal carboxílico III e o domínio I (Olin, 2001), ligados pelo domínio II, com aspecto em bastão (Olin, 2001; Argraves, 1990).

A Fibu-1 está presente na matriz extracelular e no plasma, e o gene humano que a codifica localiza-se no cromossoma 22 (Argraves, 1990).

A Fibu-2 interage com a elastina e também possui um local de ligação com a fibrilina-1 (Reinhardt, 1996). Em determinados tecidos existe uma co-localização da Fibu-2 e de fibrilina-1, nomeadamente na pele, pericôndrio, túnica íntima dos vasos sanguíneos e glomérulos renais (Reinhardt, 1996). No entanto noutros tecidos, como por exemplo tendões, cartilagem e pulmão, as fibrilinas não estão ligadas à Fibu-2, o que sugere a existência de diferenças funcionais entre as microfibrilhas, de acordo com o tipo de tecido (Reinhardt, 1996). A Fibu-2 também surge associada à fibronectina, colagénios tipo IV e VI, perlecano e lamininas 1 e 2, pensando-se que poderá ter um papel importante na formação e manutenção da integridade da membrana basal e na ligação desta aos elementos matriciais subjacentes (Olin, 2001).

Os restantes membros desta família são as fibulina-3, fibulina-4 e fibulina-5, identificadas recentemente, e que formam uma subclasse distinta denominada fibulinas classe B.

A Fibulina-5 (Fibu-5) é sem dúvida um elemento do componente microfibrilhar, e que dada a sua expressão em artérias embrionárias, lesões arterioscleróticas e artérias lesadas em processos de cateterismo, deve contribuir para a remodelação vascular, por interacção com integrinas e outras moléculas da matriz extracelular (Nakamura, 1999; Hirai, 2007).

Os murganhos transgénicos com mutação homozigótica do gene Fibu-5 (Fibu5<sup>-/-</sup>) desenvolvem lesões sugestivas de uma elastinopatia generalizada, que resulta de uma alteração no desenvolvimento das fibras elásticas (Yanagisawa,

2002; Nakamura, 2002). Tudo indica que a Fibu-5 será responsável pela ancoragem das fibras elásticas às células, actuando assim como um estabilizador e organizador das fibras elásticas da pele, pulmão e sistema vascular (Yanagisawa, 2002; Nakamura, 2002).

A fibulina-5 liga-se às integrinas pelo seu domínio terminal amino e, ao interagir com as microfibrilhas, promove a acumulação da TE fomentando a coacervação. A lisil oxidase liga-se no domínio terminal carboxílico da fibulina-5 e promove as ligações cruzadas (Hirai, 2007). Portanto a Fibu-5 promove a coacervação e participa no alinhamento e deposição da TE, ajudando também no estabelecimento das ligações cruzadas ao recrutar para a sua vizinhança a lisil oxidase (Hirai, 2007) (fig. 6).

**Durante a organogénese do murganho, as Fibu-1 e Fibu-2** encontram-se nos locais de interacção epitélio-mesênquima, sendo particularmente frequentes em tecidos embrionários e fetais, como rim, pulmão, cartilagem, folículos, dentes, sistema nervoso, no entanto nestes órgãos nem sempre estão presentes as duas fibulinas (Zhang, 1996).

A Fibu-2 tem elevada expressão no coração e mantém-se elevada durante a organogénese dos tecidos com origem no mesênquima da crista neural, sendo abundante na cartilagem, pericôndrio e cápsulas de alguns órgãos (Zhang, 1996). No pulmão do murganho a Fibu-2 apenas foi detectada nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e nas células mesenquimatosas da pleura visceral (Zhang, 1996).

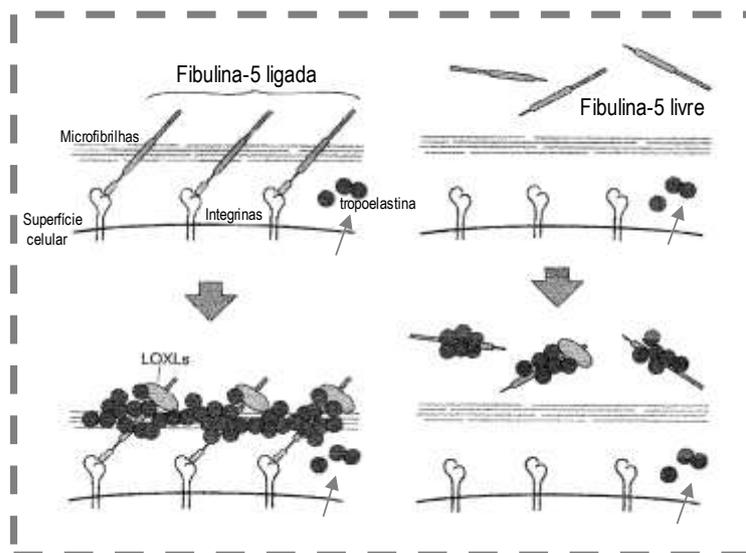


Figura 6. Esquema da acção da fibulina-5 (adaptado de Hirai, 2007).

A Fibu-1 está expressa uniformemente no mesênquima adjacente a cada brônquio e também evidencia uma forte expressão na membrana basal adjacente às células epiteliais dos brônquios principais e brônquios segmentares (Zhang, 1996). Está ainda presente nas células mesenquimatosas do intestino, rim, alguns locais do sistema nervoso e músculo liso dos vasos sanguíneos (Zhang, 1996). No período perinatal os teores de Fibu-1 decaem acentuadamente, pouco se alterando as concentrações de Fibu-2, à exceção do cérebro e pulmão, onde a sua expressão é maior ao nascimento do que durante a embriogénese (Zhang, 1996).

Os murganhos com mutação homozigótica de gene Fibu-1 (Fibu-1  $-/-$ ) têm uma elevada mortalidade fetal e perinatal, exibindo hemorragias espontâneas no crânio, pele e músculos esqueléticos e um atraso no desenvolvimento pulmonar, pois ao nascer têm septos mais espessos, escassos sacos aéreos e ausência de capacidade de distensão pulmonar (Kostka, 2001). O fenótipo destes animais sugere que a Fibu-1 tem um papel preponderante no desenvolvimento dos vasos sanguíneos, participando na angiogénese, e provavelmente actua na modulação da expressão ou da actividade de outros componentes, também eles envolvidos na angiogénese (Kostka, 2001).

Quanto à fibulina-5, durante a embriogénese está presente nos grandes vasos e válvulas cardíacas, mas após o nascimento também existe em vários órgãos como aorta, pulmão, útero e pele (Nakamura, 1999).

As **emilinas** são glicoproteínas da matriz extracelular que estão associadas às fibras elásticas, localizando-se preferencialmente na interface entre as microfibrilhas e a elastina (Bressan, 1993; Doliana, 1999; Spessotto, 2003).

A **emilina-1** tem vasta distribuição nos mamíferos, estando presente, entre outros, nos vasos sanguíneos, coração, pulmão, intestino, útero, rim, pele e globo ocular (Bressan, 1993). Possui 996 aminoácidos, com 20 resíduos de cisteína e sete potenciais locais de ligação a resíduos glicosídicos, diferindo a sua organização molecular das demais glicoproteínas da matriz extracelular (Doliana, 1999). Por esclarecer permanece o seu papel na formação e organização das fibras elásticas, e como se efectuam as ligações e interacções entre a emilina-1 e os outros componentes da matriz (Spessotto, 2003).

A **emilina-2** é uma proteína maior que a emilina-1, que possui uma sequência com 53 resíduos de prolina, com carácter hidrofílico, que lhe confere um arranjo e uma conformação diferente da emilina-1 (Doliana, 2001).

Ainda existem as emilina-3, emilina-4 e emilina-5, que estão envolvidas na osteogénese e desenvolvimento do esqueleto (Doi, 2004).

A **formação das fibras elásticas** é um processo complexo que ocorre na matriz extracelular, sendo necessário coordenar a polimerização da tropoelastina com um conjunto de moléculas, como os receptores membranares (EBP-67) e os elementos associados ao componente microfibrilar.

Dos eventos que compõem a elastogénese, ressaltam a coacervação da TE e a formação das ligações cruzadas (Vrhovski, 1998).

A **coacervação** da TE acontece quando se atinge os 37°C de temperatura, ocorrendo uma fase de separação entre a proteína e o meio viscoso (Cox, 1974). Quando a TE está a temperaturas inferiores a 20°C, é uma molécula solúvel em solução aquosa, mas se elevarmos a temperatura a solução fica cada vez mais turva, até que por volta dos 37°C, há uma separação espontânea das fases, com uma fase superior mais rica em água e uma inferior mais densa e visco-elástica, na qual se encontra a proteína (denominado coacervado) (Cox, 1974). Os coacervados da TE têm um aspecto e organização semelhante ao componente amorfo das fibras elásticas possuindo cerca de 60% de água (Cox, 1974; Vrhovski, 1998).

A coacervação resulta de uma interacção específica de determinados domínios hidrofóbicos, dispostos em locais bem definidos da molécula de TE (Toonkool, 2001), e que é determinada pelo número de domínios e pela composição e posição desses domínios na molécula. A interacção entre os domínios 18 e 26 e entre os domínios 20 e 24, os quatro maiores domínios localizados no centro da molécula, parece ter um papel importante na coacervação (Vrhovski, 1997). A coacervação aumenta a ordem intra e intermolecular, o que permite o pregueamento e associação da TE numa estrutura fibrilar (Urry, 1995).

As condições favoráveis à coacervação e posterior formação das fibras elásticas, são a concentração elevada de TE e elastina, ausência de factores que alterem a hidrofobicidade da molécula, concentração adequada de água na matriz extracelular e factores relacionados com a concentração e composição dos glicosaminoglicanos existentes na matriz.

Em resumo, a coacervação é um passo importante na elastogénese, pois concentra e alinha as moléculas de TE antes do estabelecimento das ligações cruzadas (Jensen, 2000).

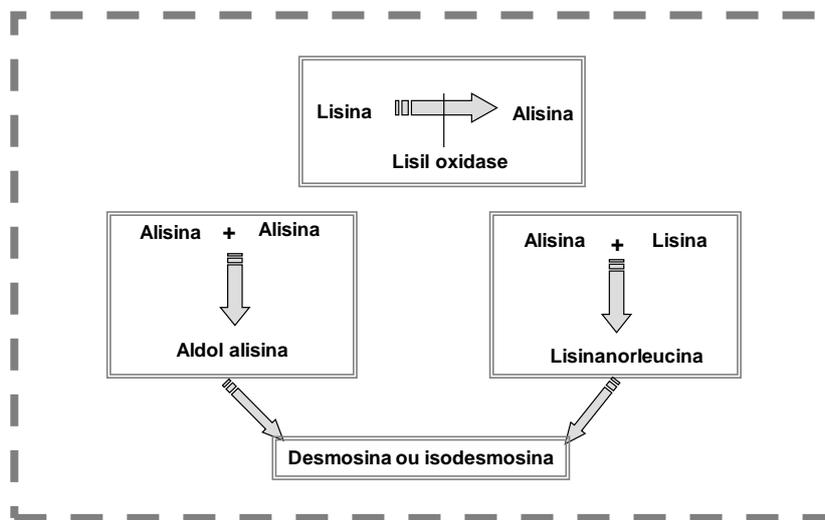
À medida que aumenta a concentração das moléculas de TE na matriz extracelular, e que estas são ordenadas pelo processo de coacervação e também pela interacção com os elementos do componente microfibrillar, a TE rapidamente é insolubilizada e polimerizada através das **ligações cruzadas** (Partridge, 1963).

A estrutura primária da TE, mostra vários locais com potencial para estabelecer as ligações cruzadas, uma vez que existem numerosos peptídeos hidrófilos dispersos entre as sequências hidrofóbicas. Mas para que ocorram as ligações cruzadas é necessário que estes domínios possuam resíduos de lisina (Lis), os únicos envolvidos no processo, e que estes domínios estejam devidamente ordenados e alinhados em sequências hidrófilas do tipo KA, as únicas com capacidade de formarem estas ligações (Vrhovski, 1998).

A reacção inicial é uma desaminação oxidativa dos resíduos de Lis, que por acção da enzima lisil oxidase (na presença do cobre), produz o aldeído denominado alisina (Lent, 1969). Todas as reacções subsequentes são espontâneas e envolvem a condensação de alisinas e resíduos de Lis localizados na proximidade e do mesmo lado da cadeia, originando-se primeiro ligações intramoleculares e, num passo posterior, ligações intermoleculares, com formação de lisinanorleucina, merodesmosina e ligações cruzadas tetra-funcionais únicas na elastina, as desmosinas e isodesmosinas (Foster, 1974; Sandberg, 1981; Rucker, 1984). Da condensação de duas alisinas forma-se o aldol de alisina, enquanto da reacção entre uma alisina e um resíduo de lisina se origina a lisinanorleucina (fig.7) (Foster, 1974; Sandberg, 1981).

Quando o resíduo lisinanorleucina de uma molécula, reage com o aldol de alisina de outra molécula, forma-se o anel piridínico da desmosina ou da isodesmosina (fig. 7).

As desmosinas também se podem formar através de uma via intermédia, em que o aldol de alisina e um resíduo de lisina, originam a merodesmosina, que posteriormente, numa segunda condensação com lisina forma desmosina ou isodesmosina (Lent, 1969).



**Figura 7.** Esquema da formação da desmosina e isodesmosina

As desmosinas e isodesmosinas ligam duas cadeias de tropoelastina, e como estão em igual proporção, no total são necessários quatro resíduos de lisinas para ligar as duas cadeias de TE (Foster, 1974).

No final do processo de elastogênese, cerca de 85 a 90% de todas as lisinas existentes na tropoelastina estão modificadas e envolvidas na formação das ligações cruzadas.

A **degradação da elastina** é um evento importante em muitos processos fisiológicos, nomeadamente no crescimento, cicatrização de feridas, gravidez e remodelação de tecidos, no entanto, uma degradação descontrolada contribui para o desenvolvimento de certas patologias, como o enfisema pulmonar e a arteriosclerose.

No homem a excreção normal de desmosina é de 40-50 mg/dia e nos fumadores com doença obstrutiva crónica, a excreção é de 400 mg/dia, provavelmente como resultado das elastases dos leucócitos e macrófagos. Se considerarmos que a elastina perdida pode não ser repostada, ou que a qualidade da elastina restituída não é igual à original, então o problema ganha outra dimensão.

A **reparação da elastina** acontece de duas formas diferentes, por síntese de nova elastina, ou por um mecanismo que restabelece as ligações intermoleculares na elastina danificada, o que é realizado pela enzima lisil oxidase.

No enfisema induzido, onde ocorre destruição proteolítica da elastina, há retorno dos níveis de elastina a valores normais, no entanto as fibras elásticas encontram-se desorganizadas e não completamente funcionais (Rucker, 1984).

Nos casos de hiperóxia ocorre supressão da expressão do gene da elastina, não se formando nova elastina, e uma diminuição da actividade da enzima ou redução do RNAm da lisil oxidase (Berk, 2005). Assim cerca de 70% da síntese de nova elastina é afectada e 21% da reparação é inibida (Berk, 2005).

#### **1.4. Elastogénese pulmonar**

A rede elástica resulta da síntese de elastina pelos fibroblastos, no entanto outras células o podem fazer, como as células musculares lisas, os condrócitos e as células endoteliais (Vrhovski, 1998).

Os principais estudos sobre a elastogénese pulmonar focalizam-se essencialmente na tropoelastina (TE) e são maioritariamente realizados em modelos experimentais com ratos e murganhos.

A expressão temporal da TE no pulmão do rato e murganho, começa na vida fetal, atingindo um pico perto do nascimento e declinando na fase neonatal até à sua ausência na maturidade (Mariani, 1999). No início da fase pseudoglandular do pulmão do rato, pouca ou nenhuma TE se encontra expressa (até E12), mas alguns dias depois, esta passa a ser detectada no músculo liso que envolve os brônquios e nas artérias pulmonares em desenvolvimento, sendo mínima a sua expressão no mesênquima pulmonar (Mariani, 1997; Mariani, 1999). Na fase canalicular, por volta do dia de gestação E18, a expressão de TE começa a ser detectada no parênquima distal, mais especificamente nos locais de ramificação, directamente adjacente ao epitélio em diferenciação, estando ausente no tecido mesenquimatoso distante do epitélio (Mariani, 1999). Na fase sacular, conjuntos de células mesenquimatosas subjacentes ao epitélio das vias aéreas, expressam elevados níveis de RNAm da TE e já se encontram fibras elásticas em redor dos sacos terminais (Mariani, 1997; Pierce, 1995). Durante a alveolização a TE está expressa em elevados níveis na parede alveolar, concentrada nos topos dos septos alveolares e nas zonas curvas da parede alveolar, precisamente onde se concentram as fibras elásticas (Mariani, 1997). A deposição na parede alveolar, coincide com o desenvolvimento das cristas secundárias, sendo portanto requerida para a normal alveolização (Mariani, 1997). De facto durante a fase pré-natal (entre os dias E15 e E19), há um aumento continuado das fibras elásticas pulmonares, que é mais intenso nos últimos dois dias de gestação (Rodrigues, 2008). O comprimento das fibras elásticas aumenta entre os dias de vida pós-natal P4 e P22, deixando de crescer depois desses dias (Bruce, 1991). Estas

observações estão de acordo com o conceito, de que as fibras fornecem uma rede estrutural em redor do qual um novo alvéolo se desenvolve, tendo assim um papel no desenvolvimento septal alveolar (Bruce, 1991).

A comprovar **o papel fundamental da elastina** no desenvolvimento pulmonar, podemos destacar o trabalho realizado por Wendel e colaboradores em murganhos com deleção do gene da elastina (Wendel, 2000). Os referidos autores, observaram que a ausência da elastina afecta a ramificação das partes distais do pulmão e que este defeito na ramificação é acompanhado por menos sacos aéreos distais (Wendel, 2000).

O trabalho de Lindahl em murganhos com deleção homozigótica de gene PDGF-A (PDGF-A -/-), permite resumir o que podem ser consideradas como as três fases da elastogénese pulmonar (Lindahl, 1997). Na fase pseudoglandular, a tropoelastina (TE) expressa-se no mesênquima oposto ao epitélio proximal, não existindo TE no mesênquima distal. Assim a deposição das fibras elásticas nos locais proximais, previne a ramificação ectópica do epitélio pulmonar. Se durante a fase pseudoglandular faltar elastina nos botões, pode ocorrer maior número de ramificações (Lindahl, 1997). Na parte terminal da fase sacular, quando já terminou a ramificação, a TE está expressa no mesênquima proximal e distal, o que leva à deposição de fibras elásticas nas paredes dos sáculos terminais, conferindo elasticidade suficiente para respirar durante os primeiros dias de vida (Lindahl, 1997). Posteriormente ocorre a deposição de elastina nos septos alveolares, processo associado à septação alveolar e realizado pelos miofibroblastos alveolares. Esta deposição é uma força crítica para a morfogénese do septo alveolar, pois na falta de deposição há perda de formação de septos (Lindahl, 1997).

De facto, na vida pós-natal dos murganhos, as fibras elásticas estão localizadas nas zonas marginais dos septos, o que acontece entre o dia P7 e P11, durante a fase em que ocorre o maior adelgaçamento da parede alveolar (Gonçalves, 2001). Até ao dia de vida P17 as fibras vão ocupando progressivamente mais área, atingindo um valor de 16,5% da área pulmonar total (Gonçalves, 2001).

No que diz respeito **a patologias das fibras elásticas**, referimos o Síndrome de Marfan, uma anomalia congénita na qual existe um defeito na fibrilina-1, mas com pouca repercussão a nível do pulmão e a Cútis Laxa, uma patologia na qual há perda de elastina e fibras elásticas no tecido conjuntivo cutâneo e no tecido conjuntivo dos compartimentos. Pode ter origem genética ou

ser adquirida, sendo que no caso genético pode resultar de uma alteração no metabolismo do cobre (relacionado com o cromossoma X) ou de uma deleção do exão 30 do gene da elastina, o que leva à produção de tropoelastina sem terminal carboxílico. A patologia pode ser adquirida como resultado de um processo inflamatório, que causa um aumento da actividade elastolítica (Daamen, 2001).

Ainda temos de referir a elastoderma, uma doença em que ocorre uma grande acumulação de tecido elástico na derme, a estenose aórtica supra-avalvular e o Síndrome de Williams, uma doença que envolve o SNC (Daamen, 2001).

A nível pulmonar temos a displasia broncopulmonar, uma doença crónica com início no período neo-natal e que resulta do alargamento dos espaços aéreos terminais, reduzindo a função pulmonar e que está frequentemente associada à hiperóxia resultante da ventilação mecânica, à qual estão sujeitos os prematuros e recém-nascidos com baixo peso à nascença (Mariani, 1999).

Temos também enfisema pulmonar, uma doença que surge na vida adulta, e que está associada a defeitos na  $\alpha$ -anti-tripsina, uma proteína inibidora das proteases, em especial da elastase, o que provoca uma destruição da elastina pulmonar (Mariani, 1999).

## **1.5. Vitamina A**

A designação vitamina A engloba um conjunto de compostos naturais ou sintéticos, que exibem actividade e propriedades biológicas semelhantes às dos compostos trans-retinol, embora de forma mais restrita, se use este termo para designar o retinol.

Ainda mais genérico é o termo retinóides, que se refere tanto aos compostos naturais com actividade semelhante à vitamina A, como aos análogos sintéticos do retinol, quer possuam ou não actividade igual à do retinol (Goodman, 1984).

Os retinóides abrangem um grupo de compostos que incluem o ácido retinóico, retinol e uma série de derivados naturais e sintéticos, os quais exercem efeitos no desenvolvimento e diferenciação de vários órgãos. Os retinóides têm uma estrutura comum, que inclui um grupo cíclico terminal, uma cadeia tetraeno e um grupo polar terminal, que no caso do retinol é o hidroxilo, no retinaldeído é o aldeído e no ácido retinóico (AR) o carboxilo (Rodrigues, 2004).

Os primeiros efeitos dos retinóides, neste caso do retinol, foram detectados por Wolbach e colaboradores, quando submetem os seus animais de experimentação a uma dieta sem vitamina A (Wolbach, 1925). Os danos foram

observados no epitélio do sistema respiratório, tubo digestivo, olhos e sistema urogenital, havendo uma substituição do epitélio normal destes órgãos, por um epitélio pavimentoso queratinizado (Wolbach, 1925). Mais tarde, os mesmos autores verificaram que o epitélio pavimentoso queratinizado era morfológicamente idêntico nos diferentes órgãos, e que a reintrodução de retinol na alimentação revertia o processo, havendo um retorno ao epitélio original (Wolbach, 1933).

Desde esta altura que a importância da vitamina A na morfogénese, homeostase e reparação pulmonar, tem sido alvo de vários estudos (Torday, 2004; Shi, 2009), tendo também interessado investigadores das áreas de dermatologia, oncologia e desenvolvimento embrionário (De Luca, 1991; Goodman, 1984).

Durante o desenvolvimento fetal, o pulmão acumula derivados dos retinóides, nomeadamente ésteres de retinilo e retinol (Geevarghese, 1994; McGowan, 1997b) e ao que tudo indica a molécula biologicamente activa não será o retinol, mas sim o ácido retinóico (Chytil, 1992; Chytil, 1996).

De facto a deficiência em ácido retinóico durante a gestação causa sérias anomalias no desenvolvimento pulmonar, entre as quais se incluem a hipoplasia e agenesia do pulmão (Mendelsohn, 1994; Desai, 2004; Wang, 2006).

O ácido retinóico (AR) é a forma activa dos retinóides, que resulta de um processo de múltiplas oxidações do retinol, e que tem um largo espectro de actividade. O efeito pleiotrópico que esta molécula estruturalmente simples exerce, deve-se á variedade de isoformas de AR, ao polimorfismo do seu receptor, em especial do receptor RAR, e ao facto de o receptor RXR poder formar heterodímeros com outros receptores (Mendelsohn, 1994, Rodrigues, 2004).

As **principais fontes** de vitamina A são os carotenoides de origem vegetal, sendo o principal o  $\beta$ -caroteno, e de origem animal, os ésteres de retinilo. O metabolismo e homeostase dos retinóides é controlado não só pela sua disponibilidade dietética, mas também por um apurado mecanismo de absorção, transporte, reserva e mobilização (Blomhoff, 1990; Goodman, 1984). Os carotenoides são absorvidos directamente pelas células epiteliais e nos enterócitos parcialmente convertidos em retinol e os ésteres de retinilo são hidrolisados no lúmen intestinal, convertendo-se em retinol, que depois é transportado por endocitose para o interior dos enterócitos (Blomhoff, 1990).

Cerca de 75% a 95% dos retinóides não estão nos hepatócitos, mas sim nas células estreladas ou células de Ito, podendo ser depositado noutros órgãos como rim, intestino, olhos e pulmão, embora no adulto este armazenamento seja mínimo, quando comparado com a quantidade acumulada no fígado (Blomhoff, 1990).

No plasma o retinol circula ligado a um complexo formado por duas proteínas, a proteína ligante do retinol (RBP) e a transtirretina (TTR) (Newcomer, 2000; Noy, 2000).

A sobrevivência dos animais transgênicos RBP<sup>-/-</sup> permite considerar que existe uma via alternativa e independente à da RBP, que depende da dieta em vitamina A, e que permite que o retinol funcione localmente, ou seja libertado para o plasma e redistribuído para outros órgãos (Ross, 1999; Quadro, 1999).

No interior da célula o retinol encontra-se complexado com as proteínas celulares ligantes do retinol – CRBP tipo I ou tipo II, sendo praticamente indetectável retinol na sua forma livre (Napoli, 1996). A CRBP-I tem uma vasta distribuição, tanto nos fetos como nos animais adultos, sendo especialmente elevada no epididímo, rim, fígado, pulmão e baço (Ong, 1982) e ao que parece, os seus níveis estão condicionados pela disponibilidade de retinóides no organismo (kato, 1985). Durante o desenvolvimento, a CRBP-I está envolvida na manutenção de uma adequada concentração de AR nos diferentes tipos de células, sobretudo durante a embriogénese e organogénese (Dollé, 1990).

O retinol complexado pode ter diferentes destinos: ser transformado em AR; ser excretado de volta para o meio extracelular, caso não haja necessidade imediata de retinóides ou ser acumulado na forma de ésteres de retinilo (Goodman, 1984; Blomhoff, 1990).

A reacção de **conversão do retinol em retinal**, pode ser catalisada por várias enzimas pertencentes a duas famílias enzimáticas: as desidrogenases do álcool (ADH), com localização citosólica, e as desidrogenases/redutases de cadeia curta (SDR), com localização citosólica e membranar (Duester, 1996; Duester, 2000). A transformação **irreversível do retinal em ácido retinóico**, pode ocorrer por duas vias enzimáticas alternativas: a via citosólica, catalisada por enzimas dependentes do NAD e pertencentes à família das desidrogenases do aldeído, e a via microsomal associada à membrana do retículo endoplasmático, catalisada por enzimas pertencentes á superfamília multigénica do citocromo P450 (CYPs), dependentes do NADPH e que actuam na presença da NADPH-P450 redutase (Duester, 1996; Duester, 2000).

## **Retinol no pulmão**

As células que armazenam o **retinol no pulmão** são semelhantes às células estreladas ou de Ito do fígado (Okabe, 1984). Encontram-se nos septos e apresentam uma forma estrelada, um núcleo de forma irregular e com 2 a 3 nucléolos, superfície celular com poucas projecções e um citoplasma com numerosas gotículas contendo vitamina A, RER abundante e ribossomas livres (Okabe, 1984). No pulmão em desenvolvimento, estas células são os fibroblastos com gotícula lipídica (LICs), que se encontram no tecido conjuntivo dos septos primários (Shenai, 1990a; McGowan, 1997b). Os LICs estão presentes durante a alveogénese (Maksvytis, 1981; McGowan, 1997a), período em que há um aumento do número destas células, que são o alvo do ácido retinóico (AR) exógeno (Bruce, 1999). Os LICs são os principais produtores de tropoelastina (McGowan, 1997a), que sob a acção do AR aumentam a síntese e deposição desta proteína da matriz extracelular (McGowan, 1997b).

Por volta do dia de gestação E14, são detectados ésteres de retinilo no pulmão fetal dos ratos e a sua concentração vai aumentando rapidamente, até atingir um pico por volta do dia E18. Segue-se um declínio, atingindo-se o valor mais baixo nos primeiros dias de vida pós-natal (Shenai, 1990a; McGowan, 1997b). No fígado a concentração de ésteres de retinilo permanece constante durante o período pré-natal, aumentando no período pós-natal (Shenai, 1990a).

De facto, na última terça parte da vida pré-natal, há um armazenamento de vitamina A, sendo nesse período que se atinge o valor máximo, que depois declina até ao nascimento e início da vida pós-natal (Shenai, 1990a), o que permite relacionar o decréscimo dos ésteres de retinilo, com a maturação morfológica do pulmão (Geevarghese, 1994). O pulmão em desenvolvimento depende deste armazenamento local de vitamina A, durante a fase final de crescimento e diferenciação celular (Shenai, 1990a).

Durante a gestação, **o transporte do retinol materno para o feto** é feito via placenta e ligado à proteína RBP (Takahashi, 1977). Nos ratos, a partir do dia de gestação E11, o complexo retinol-RBP materno atravessa a placenta sendo assim, transferida vitamina A da mãe para o feto (Takahashi, 1977). Os fetos começam a sintetizar RBP no dia E16, e quando nascem, o seu fígado já tem a capacidade de produzir a RBP suficiente para fornecer vitamina A aos tecidos que dela necessitam (Takahashi, 1977).

## Ácido retinóico

A importância da diversidade da acção biológica do ácido retinóico (AR), reside na capacidade das suas isoformas (all-trans, 9-cis e 13-cis) regularem a transcrição genética, actuando directamente sobre centenas de genes, o que acontece através dos receptores nucleares (Chambon, 1996; Balmer, 2002; Dollé, 2009).

O **receptor RAR** pertence a uma família de receptores esteroides da hormona tiroideia (Giguere, 1987; Petkovich, 1987), que apresenta três isotipos ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$  e  $RAR\gamma$ ), sendo que para cada isotipo podem existir várias isoformas ( $RAR\alpha$  ( $\alpha1$  e  $\alpha2$ ),  $RAR\beta$  ( $\beta1$ - $\beta4$ ) e  $RAR\gamma$  ( $\gamma1$  e  $\gamma2$ )) (Chambon, 1996; Mollard, 2000).

O **receptor RXR** também apresenta três isotipos-  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e as isoformas  $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ,  $\beta1$ ,  $\beta2$ ,  $\gamma1$  e  $\gamma2$  (Mangelsdorf, 1990; Chambon, 1996).

A unidade funcional que traduz o sinal do AR está composta por heterodímeros RAR/RXR (Kastner, 1997), o que faz com que as oito variantes de RAR e as seis variantes de RXR existentes, possibilitem a combinação de 48 heterodímeros, o que explica a diversidade da acção do ácido retinóico nos diferentes tecidos durante as fases pré e pós-natal, e ao longo da vida adulta (Chambon, 1996; Kastner, 1997; Dollé, 2009).

O modelo de ligação dos receptores do AR ao ADN pressupõe dois passos: primeiro o receptor RXR liga-se a um elemento RAR, formando o heterodímero RXR/RAR, e depois o heterodímero liga-se ao RARE pelas regiões de ligação ao ADN, sendo o reconhecimento e a ligação à sequência apropriada, consequência de modificações conformacionais que ocorrem aquando da dimerização dos dois receptores (Mader, 1993).

A **disponibilidade celular do ácido retinóico** é regulada por duas enzimas, a **retinaldeido desidrogenase (RALDH)**, envolvida no mecanismo de síntese (Zhao, 1996), e a **P450RAI** envolvida na degradação, sendo o equilíbrio entre a síntese e degradação, que determinará a concentração de AR disponível nos tecidos/células.

O sinal dos retinóides também pode ser controlado pela inibição do seu receptor, o que acontece quando o receptor nuclear **COUP-TFII** -“chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor” sequestra os RXRs (Malpel, 2000; Pereira, 1999).

Existem **duas proteínas intracelulares**, que actuam como veículos que transportam os retinóides entre o citoplasma e os locais de ligação presentes no núcleo (Takase, 1986). A **proteína celular ligante do retinol (CRBP-I e CRBP-II)** que liga o retinol, e tem a função de armazenar ou libertar retinol, de acordo com as necessidades de AR para determinados processos morfogénéticos (Ong, 1975).

A outra proteína, a **proteína celular ligante do ácido retinóico (CRABP-I)**, liga o ácido retinóico (Ong, 1976; Ong, 1975) e apreende-o em regiões onde são requeridos baixos níveis deste metabolito (Ong, 1982), servindo também como seu transportador (Napolí, 1996).

Nos ratos adultos está distribuída por muitos órgãos como por exemplo olhos, testículos, ovários, útero, rim, pulmão (Ong, 1982), sendo detectada em todos os órgãos fetais do rato, no entanto desaparecendo durante o desenvolvimento de alguns destes órgãos (Ong, 1976; Ong, 1975).

A CRABP pulmonar aumenta logo após o nascimento, atingindo o valor máximo ao dia de vida pós-natal P10, seguindo-se um acentuado declínio, e deixando de ser detectada no dia P21, mantendo-se assim durante a vida adulta (Ong, 1976). O aumento da CRABP nesta fase da vida pós-natal do rato, parece estar relacionado com o período em que os alvéolos se formam, o que mais uma vez sugere um papel do AR na formação destas estruturas (Ong, 1976).

Mais tarde foi identificada a isoforma da CRABP-II, abundante durante a embriogénese do murganho, que na vida adulta apenas se expressa na pele (Giguere, 1990), no entanto a CRABP-I tem cerca de três vezes mais afinidade com o AR que a isoforma CRABP-II (Rodrigues, 2004).

A existência de poucas malformações nos animais com mutação nestas duas proteínas (CRAB-I e II), pode dar a entender que estas não são críticas para a homeostase intracelular do AR e para a protecção celular do AR, funções que já lhe haviam sido atribuídas (Lampron, 1995; Fawcett, 1995). No entanto, a sua conservação ao longo da evolução, certamente que estará relacionada com alguma função que confira vantagem evolutiva aos seus portadores (Lampron, 1995), não restando qualquer dúvida de que estão envolvidas no desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores (Fawcett, 1995).

A ligação entre o AR e o núcleo até pode ser que ocorra sem transportador, no entanto o complexo CRABP-AR poderá favorecer a ligação e/ou evitar ligações não específicas, contribuindo para síntese do AR e para o desenvolvimento das estruturas que dependem deste metabolito (Takase, 1986).

## **Ácido retinóico no desenvolvimento pulmonar**

A vitamina A tem sido considerada como um dos principais factores na diferenciação e maturação do pulmão (Chytil, 1992; Chytil, 1996; Biesalski, 2003), não existindo dúvidas de que os retinóides, em especial o ácido retinóico, são fundamentais para o desenvolvimento pulmonar (Pinto, 2010). Para que o AR actue adequadamente no embrião, é necessário que exista uma coordenação, no espaço e no tempo, das enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação, dos seus receptores nucleares e das sequências genómicas reguladoras da transcrição (Chambon, 1996).

Uma vez que a acção específica do AR durante as várias fases do desenvolvimento pulmonar já foi referida anteriormente, resumiremos apenas os aspectos mais relevantes.

Logo no **início do desenvolvimento pulmonar**, no período em que os botões primordiais se formam, há abundante síntese e utilização do AR por parte do intestino anterior, o que comprova o seu directo envolvimento na formação do botão primordial do pulmão (Malpel, 2000; Cardoso, 2004; Desai, 2004; Desai, 2006), facto que é evidenciado pela morte embrionária (dia E10,5) dos animais sujeitos a alterações na síntese de AR (Zhao, 1996; Nierreither, 1999) e pelas graves malformações em animais com défice de vitamina A (Mendelsohn, 1994; Dickman, 1997; Kastner, 1997; Desai 2004; Wang, 2006).

Durante o **processo de ramificação**, o sinal do ácido retinóico mantém-se baixo e os níveis da enzima RALDH-2 são localmente controlados, de tal forma que esta se concentra nos locais com menor actividade de ramificação (Malpel, 2000). Com o início do aparecimento dos botões laterais, estabelece-se um gradiente proximal-distal de AR, havendo menor concentração no mesênquima distal, junto aos locais de brotamento (Malpel, 2000).

No mesênquima a inactivação do sinal do ácido retinóico permite a expressão do FGF-10, factor que é o principal responsável pelo processo de ramificação (Bellusci, 1997b; Chen, 2007). O efeito inibidor do AR sobre o FGF-10 envolve outras moléculas presentes no epitélio ou mesênquima mas, ao que tudo indica, o AR pode actuar activando o SHH, que inibe a expressão do Fgf-10 via Ptch presente no mesênquima (Bellusci, 1997b) ou controlar a actividade do TGF- $\beta$ , que actua na expressão local de FGF-10 e indução dos botões pulmonares (Chen, 2007).

Numa fase mais avançada do desenvolvimento pulmonar, **fase de alveolização**, o AR está funcionalmente envolvido na produção de surfactante (Metzler, 1993; Fraslon, 1994), na indução da formação dos septos alveolares (Massaro, 1996b; Massaro, 2000a; Massaro, 2000b), na diferenciação celular (Chytil, 1992; Costa, 2001; Bielsalski, 2003; Wongtrakool, 2003) e na síntese e deposição da elastina (Lui, 1993; McGowan, 1995; Massaro, 1996a; McGowan, 1997a; McGowan, 1997b; McGowan, 2000).

De facto é na fase final da vida fetal e início da pós-natal, que ocorre um aumento da expressão do RNA-m do ácido retinóico, dos receptores RARs e da proteína CBRP, o que é consistente com a hipótese de que o AR endógeno contribui para o desenvolvimento da fase de alveolização pulmonar (Chytil, 1992; McGowan, 1995; McGowan, 1997a; Torday, 2004).

### **Impacto clínico dos retinóides**

Apesar da vasta investigação sobre retinóides, em especial retinol e ácido retinóico, a tão esperada **“revolução clínica” dos retinóides** ainda se encontra limitada. São conhecidos os efeitos benéficos do palmitato de retinilo na xeroftalmia, no entanto, a escassa informação dos clínicos sobre os seus efeitos no desenvolvimento embrionário, fetal e pós-natal, e a existência de registos clínicos sobre os efeitos teratogénicos, são responsáveis pela diminuta utilização terapêutica dos retinóides (Chytil, 1996).

Está comprovado que o ácido retinóico exógeno tem capacidade de regeneração alveolar (Hind, 2004; Maden, 2006; Doi, 2009), um processo complexo e multifacetado que requer a coordenação da proliferação e maturação das células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos, da migração celular e da produção regulada dos componentes da matriz extracelular (McGowan, 2006).

Os retinóides também limitam a inflamação, ao reduzir a morte celular e a degradação da matriz extracelular (Bruce, 1999). São capazes de inibir os danos causados pela elastase, a enzima responsável por um aumento da apoptose celular e um aumento da fragmentação do ADN (Nakajoh, 2003). Pode actuar directamente na acção da elastase, e indirectamente inibindo a actividade da caspase-3, que está envolvida na apoptose, podendo ter um efeito protector no desenvolvimento do enfisema pulmonar (Nakajoh, 2003).

Nas doenças inflamatórias, o AR repõe o nível de expressão do receptor muscarínico 2 (MR2) e restaura parcialmente as fibras elásticas sub-epiteliais, exercendo assim uma potencial função reparadora das vias aéreas e alvéolos

(McGowan, 2004a; George, 1997). De facto, os animais com déficit de vitamina A, apresentam vias aéreas hiper-reativas, o que se deve à diminuição da expressão e acção do receptor MR2 (McGowan, 2004a).

Estudos epidemiológicos mostram que os recém-nascidos prematuros com 36 ou menos semanas de gestação, apresentam menor concentração plasmática em vitamina A e em proteína ligante do retinol (RBP), do que os recém-nascidos com gestação completa (Shenai, 1981). Nos recém-nascidos com baixo peso à nascença, a concentração de vitamina A no fígado é baixa, assim como o valor plasmático de vitamina A e da proteína RBP (Shenai, 1985). O baixo nível plasmático de vitamina A durante a primeira semana de vida dos prematuros, está associado com um aumento do risco de morte ou com o desenvolvimento de doenças crónicas pulmonares (Inder, 1998). Nestes prematuros ainda se verifica que existe uma relação entre o baixo nível de vitamina A e o aumento do risco de desenvolvimento de retinopatias (Inder, 1998).

As crianças prematuras que desenvolvem displasia broncopulmonar (DBP), apresentam baixas concentrações plasmáticas de retinol (Inder, 1998), baixos níveis de retinol no fígado (Shenai, 1990b) e baixos níveis plasmáticos da proteína RBP (Shenai, 1995). De facto, os recém-nascidos com DBP apresentam maior deficiência em vitamina A (Shenai, 1995; Shenai, 1990b), o que de algum modo revela que a deficiência nesta vitamina, contribui para o desenvolvimento de doenças crónicas pulmonares.

Uma das estratégias dos países desenvolvidos para reduzir significativamente a mortalidade infantil, e reduzir a incidência de infecções respiratórias e doenças gastrointestinais, é a administração de suplementos de vitamina A (Mactier, 2005).

A administração de várias doses de vitamina A, a prematuros com baixo peso á nascença sujeitos a ventilação mecânica, foi responsável por um aumento no nível plasmático da vitamina A e um aumento no nível de RBP. O suplemento vitamínico ainda promove a regeneração das lesões pulmonares, ao reduzir a morbidade associada à DBP (Shenai, 1987; Shenai, 1990b).

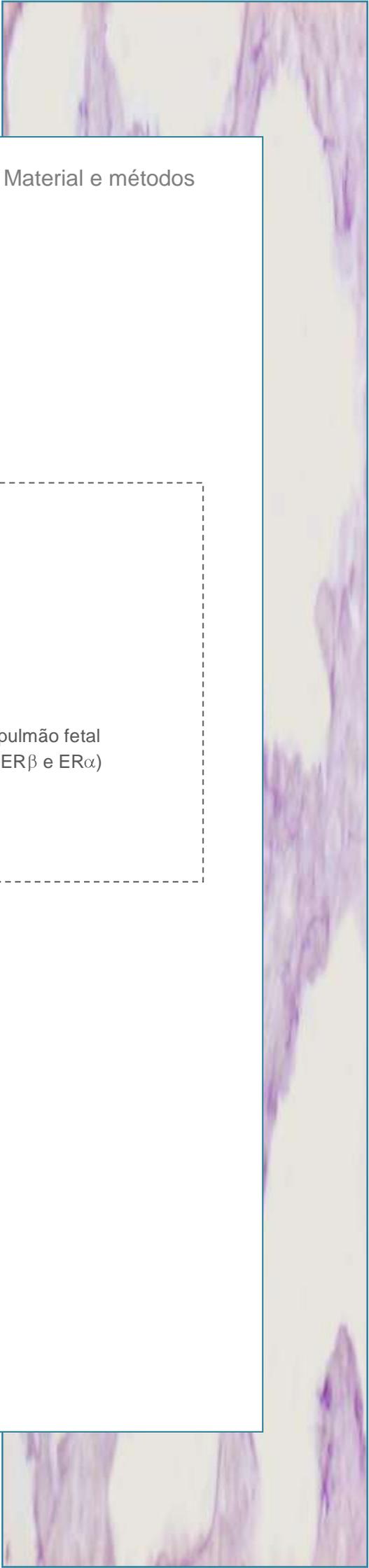
No tratamento de prematuros com vitamina A, Kennedy e seus colaboradores descrevem uma redução na incidência de doenças broncopulmonares e uma diminuição da mortalidade (Kennedy, 1997). Neste ensaio clínico foram administradas várias doses de vitamina A, via intramuscular, com a intenção de atingir um determinado valor plasmático de vitamina A, porém,

segundo os autores, a dosagem adequada poderá ser superior à utilizada, uma vez que não foi observada toxicidade (Kennedy, 1997).

Na administração de suplemento vitamínico 48 horas após o nascimento, também houve uma redução significativa (cerca de 22%) da mortalidade dos recém-nascidos, durante os primeiros 3-4 meses de vida, observando-se que o maior benefício acontece nas crianças com baixo peso à nascença (Rahmathullah, 2003).

Mais de 20 anos após o reconhecimento de que as crianças prematuras apresentam um déficit de vitamina A, ainda não se sabe qual a dose e a via mais adequada para a administração da vitamina A (oral, intravenosa ou intramuscular), mas ao que os estudos indicam, o nível plasmático de RBP pode ser um útil e adequado indicador do *status* de vitamina A nos recém-nascidos prematuros (Shenai, 1990b; Shenai, 1995).

Para uma segura utilização da vitamina A são necessários mais estudos que permitam quantificar as doses a administrar, determinar as doses armazenadas, saber as vias de administração e os efeitos a longo prazo da sua aplicação (Mactier, 2005).



## Material e métodos

### 2.1. Protocolo experimental

### 2.2. Metodologia

- 2.2.1. Preparação histológica do pulmão
- 2.2.2. Quantificação das fibras elásticas por análise de imagem
- 2.2.3 Quantificação da elastina por HPLC
- 2.2.4. Quantificação do retinol e palmitato de retinil no fígado e pulmão fetal
- 2.2.5. Estudo imunocitoquímico dos receptores de estrogénios (ER $\beta$  e ER $\alpha$ )

### 2.3. Análise estatística dos resultados

## 2.1. Protocolo experimental

Os machos e fêmeas de murganhos CD1 utilizados no trabalho, foram adquiridos no “Charles River Laboratories- Research Models and Services- Barcelona”, com 10-12 semanas de idade. Considerados como bons modelos de experimentação na área da biologia/biomedicina, estes animais partilham um elevado grau de homologia a nível do genoma humano, são pequenos, de baixo custo e de fácil manutenção e manuseamento.

Os murganhos foram mantidos em armários de manutenção para animais (IFFA-CREDO a Charles River Company), com temperatura ambiente de 21°C e com um ciclo de luz/escuro de 8/12 horas. A água foi provida em regime de “ad libitum” e a dieta alimentar usada foi o granulado standard (SAFE- Scientific Animal Food & Engineering). Como os machos exibem comportamentos agressivos e tendência para estabelecer relações hierárquicas, permaneceram sempre em caixas individuais, enquanto as fêmeas foram colocadas em caixas de 6 ou menos animais, sendo mantidas em armários diferentes aos dos machos antes e depois do acasalamento.

O acasalamento foi executado em regime poligâmico, sendo colocadas no final da tarde, três fêmeas em cada compartimento individual dos machos. Os animais permaneceram juntos durante a noite, o que equivale a um total de aproximadamente 16 horas. Embora os curtos períodos de acasalamento diminuam muito a probabilidade de obtenção de fêmeas gestantes, têm a vantagem de permitir uma correcta datação do início da gestação (Broustail, 1967). Este aspecto é muito importante em espécies animais com tempo de gestação muito curto, nos quais pequenas diferenças podem reflectir grandes alterações morfogénicas e funcionais, especialmente quando pretendemos estudar a fase pré-natal, como foi o nosso caso.

Dada a elevada dificuldade na reprodução e sabendo que quando as fêmeas se encontram juntas estão em anestro (efeito de Whitten), estas partilhavam o armário dos machos 48 horas antes do acasalamento, a fim de induzir o início do estro.

A manhã seguinte ao acasalamento foi considerada como o primeiro dia de gestação, caso fosse confirmada a gravidez, com a presença do rolhão vaginal. Logo após o acasalamento os animais voltaram a ser colocados em armários diferentes, a fim de evitar o denominado efeito de Bruce, no qual a presença do

macho pode induzir o aborto. Tivemos ainda o cuidado adicional de separar as fêmeas gestantes das não gestantes.

O protocolo experimental estabelecido consistiu em dois grupos base – o controlo e o com vitamina A, divididos em subgrupos de machos e fêmeas, perfazendo um total de quatro grupos (fig. 1). Em todo o estudo experimental foi realizado um total de 114 gestações, das quais obtivemos 1200 fetos.

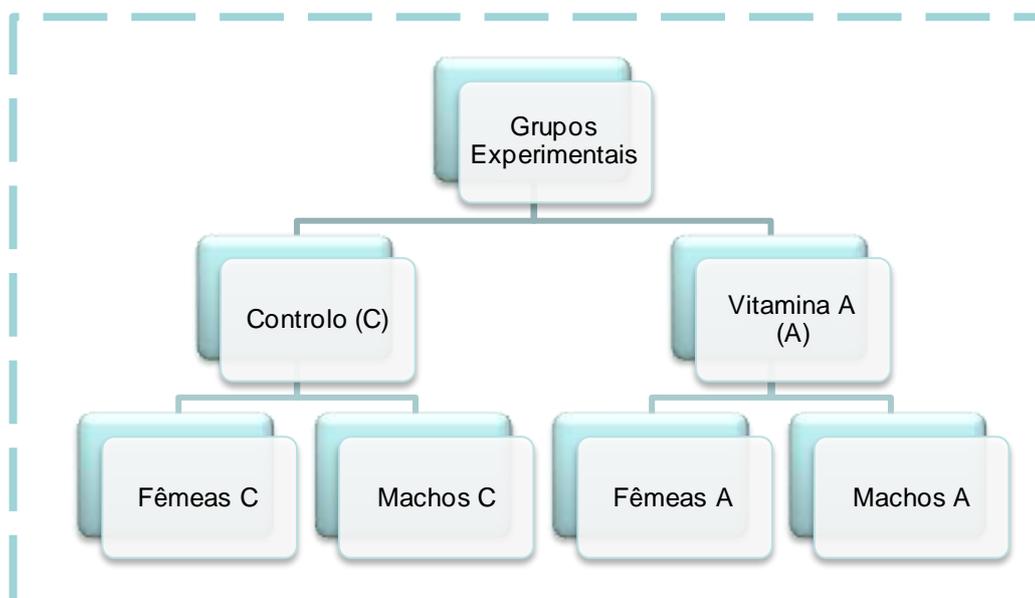


Figura 1. Grupos experimentais

O foco do estudo foi o período pré-natal, tendo iniciado as colheitas ao dia de gestação E15 e terminado ao dia de gestação E19. As fêmeas gestantes do grupo controlo, não foram sujeitas a qualquer tipo de manuseamento, no entanto, as gestantes do grupo com vitamina A foram inoculadas ao dia de gestação E12 com uma dose única de 150 $\mu$ l (via subcutânea) de Arovit<sup>®</sup> (ampolas de 1ml contendo 300000 UI de vitamina A, do laboratório Roche), o que corresponde a 45000 UI de vitamina A (Rodrigues, 2003). No entanto, ao contrário do estudo anteriormente realizado, começámos a observar uma elevada taxa de mortalidade e defeitos no desenvolvimento dos membros inferiores e superiores dos fetos, o que nos fez ponderar e considerar que estaríamos perante efeitos teratogénicos da vitamina A. Por este motivo foi mantida a dosagem, mas a administração da vitamina A passou a ser efectuada ao dia de gestação E14.

Na altura da colheita dos fetos, as fêmeas gestantes foram submetidas à administração intramuscular da solução de ketamina/xilazina, na dose de 0,05mg/g por peso vivo e após esternotomia, foi administrada por via intracardíaca, 0,3ml da solução de heparina sódica na concentração de 5000UI/ml. Depois da difusão do anticoagulante na circulação geral materna, os

fetos foram recolhidos por cesariana e imediatamente colocados em soro fisiológico. Com a maior brevidade possível foram retirados os pulmões fetais, sendo necessário recorrer ao uso de uma lupa, uma vez que os fetos apresentavam tamanho pequeno e os pulmões reduzidas dimensões (fig. 2). Na amostragem houve o cuidado acrescido de eliminar a traqueia, o coração e os grandes vasos, órgãos que muitas vezes ficavam aderentes ao pulmão.



Figura 2. Aspecto geral dos fetos durante os cinco dias de gestação.

Os pulmões recolhidos para os estudos por microscopia de luz, foram fixados em formaldeído tamponado (10%), enquanto os pulmões utilizados nas análises por HPLC, foram colocados em "ependorfs" e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para além do pulmão, extraímos o fígado, que foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para determinação do teor de retinol e palmitato de retinilo por HPLC e a pele da região dorsal dos fetos, para um eventual estudo das fibras elásticas.

A determinação do sexo dos fetos, foi realizada no dia seguinte à cesariana e com recurso a uma lupa, foi possível determinar com exactidão o sexo dos fetos dos dias de gestação E16, E17, E18 e E19.

Como não era viável a utilização deste método nos fetos do dia de gestação E15, foi necessário proceder à amostragem individual das gónadas em desenvolvimento e proceder à sua identificação por microscopia de luz. Dadas as reduzidas dimensões dos órgãos reprodutores, os fragmentos foram imersos no líquido de Bouin, a fim de adquirir alguma cor e assim facilitar a sua visibilidade durante a fase de inclusão, sendo depois seccionados com a espessura de  $5\mu\text{m}$ ,

corados com a técnica de rotina de hematoxilina eosina e devidamente identificados (fig.3).

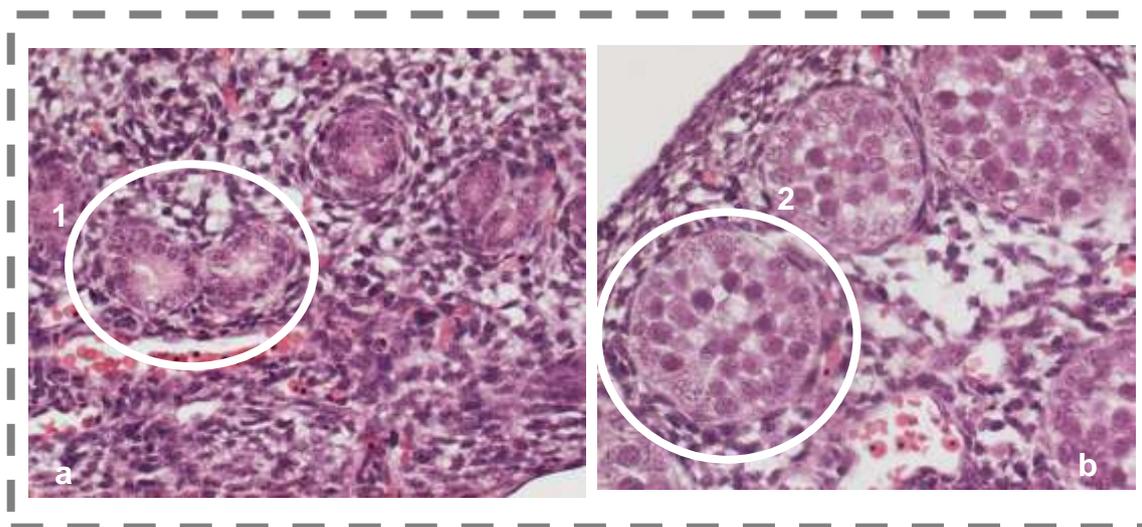


Figura 3. Corte histológico dos órgãos reprodutivos dos fetos do dia de gestação E15.

Legenda: a -ovário fetal (200x, HE); b – testículo fetal (200x, HE); 1. Folículos em desenvolvimento; 2. Túbulos seminíferos em desenvolvimento

Nas amostras pulmonares retiradas para microscopia de luz, foram quantificadas as fibras elásticas por análise de imagem e pesquisada a expressão dos receptores de estrogênios alfa e beta ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) por imunocitoquímica. Nos pulmões fetais congelados, procedeu-se à quantificação da elastina, do retinol e palmitato de retinilo, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

No que diz respeito aos fígados fetais, o estudo restringiu-se à quantificação do retinol e palmitato de retinilo, por HPLC. Os fragmentos de pele seguiram os trâmites normais de processamento histológico, corados com hematoxilina-eosina, para estudar a estrutura tecidual e ainda com a técnica modificada de coloração de fibras elásticas, a fim de observar eventuais alterações no padrão de distribuição ou na quantidade de fibras.

## 2.2. Metodologia

Para facilitar a leitura e compreensão da metodologia utilizada, os equipamentos, reagentes e preparação de soluções/corantes foram descritos separadamente e remetidos para o apêndice técnico, disponível no final da tese.

### 2.2.1. Preparação histológica do pulmão

Logo após a sua colheita, os pulmões fetais foram imersos numa solução de formaldeído a 4% v/v em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M a pH 7,4. O tempo de fixação à temperatura de 4°C, oscilou entre as 8 e 12 horas de acordo com o período de gestação e a dimensão pulmonar.

As amostras foram colocadas no equipamento de processamento histológico, tendo sido desidratadas em sucessivos banhos de etanol com crescentes concentrações (álcool 70°, 90° e absoluto), seguindo-se a diafanização em xilol e por fim, imersão num banho de parafina líquida para remoção do xilol e para conferir consistência ao fragmento.

Na inclusão em parafina, os fragmentos foram posicionados com a orientação ventro-dorsal em relação ao plano de corte e de cada pulmão fetal foi feito um bloco, seccionado no micrótomo a uma espessura de 5µm, cujas ténias foram colocadas em lâminas de vidro previamente revestidas com lisina.

Para cada grupo experimental foram feitas amostragens mínimas de seis animais por dia de gestação, tendo o cuidado de pertencerem a pelo menos 3 ninhadas diferentes. No entanto, o número de amostras foi sempre superior pois, quando procedíamos à colheita dos pulmões ainda não havíamos determinado o sexo dos fetos. Essa determinação foi realizada no dia seguinte pois pretendíamos reduzir o tempo de extracção do pulmão e também, porque a imersão em formol conferia maior consistência ao feto, facilitando a observação dos órgãos reprodutores. De referir que para o dia de gestação E15, foi necessário obter maior número de amostras, devido às reduzidas dimensões dos fragmentos pulmonares.

A **coloração hematoxilina-eosina** é a principal técnica histológica que permite diferenciar estruturas basófilas (pela hematoxilina) e acidófilas ou eosinófilas (pela eosina), o que possibilita a observação estrutural dos tecidos. A hematoxilina tem atracção pelos componentes ácidos dos tecidos, como proteínas, núcleo, retículo endoplasmático rugoso e ácidos nucleicos, conferindo-lhes uma cor azul. Já a eosina, sendo acidófila, confere cor rosa ao citoplasma, fibras de colagénio e outras estruturas com carácter básico.

A utilização desta técnica no nosso trabalho, permitiu-nos observar o arranjo estrutural do pulmão durante as três fases do desenvolvimento pulmonar que o nosso estudo engloba (pseudoglandular, canalicular e sacular). O procedimento técnico, teve início com a desparafinação em xilol das secções tecidulares,

seguinto-se a desidratação em álcool absoluto e depois em álcool 95°, tendo cada uma destas fases a duração aproximada de 5 minutos.

Os fragmentos foram hidratados em água corrente (5 min.) e depois colocados em hematoxilina de Mayer, durante 15 minutos. Os cortes foram lavados em água corrente e aí permaneceram a azular durante 10 minutos. Foram corados com eosina (5 min.), e depois colocados em álcool 95°, seguindo-se a imersão em álcool 100° e por fim no xilol, ficando os cortes prontos para a montagem definitiva.

## **2.2.2. Quantificação de fibras elásticas por análise de imagem**

### **Método de coloração das fibras elásticas**

Para realizar o estudo quantitativo do teor de fibras elásticas por análise de imagem, necessitamos de corar e evidenciar as fibras, o que foi conseguido através da técnica de coloração desenvolvida por Gonçalves e seus colaboradores (Gonçalves, 1998) que tem por base a técnica de Gomori. A técnica foi otimizada após vários ensaios, tendo demonstrado ser um método selectivo e reprodutível para destacar as fibras elásticas tecidulares.

Os cortes histológicos foram inicialmente desparafinados em xilol, desidratados em álcool absoluto e álcool 95° e depois hidratados em água corrente. Seguiu-se uma fase de pré – oxidação na solução de Lugol 2% (5 min.), uma rápida lavagem em água destilada e o tratamento com solução de bissulfito de sódio (1 min.). O passo seguinte foi a lavagem em água corrente, seguida de rápidas lavagens em água destilada e em etanol 70%. Os cortes histológicos permaneceram na solução corante durante 2 horas e depois foram lavados em água destilada. Foi realizada uma diferenciação com álcool clorídrico 1% (10 min.), seguindo-se uma lavagem em etanol 70° (1 min.) e a diafanização e montagem definitiva dos cortes.

## Quantificação de imagem

Para cada grupo, foram efectuadas entre 40 a 50 fotografias, em diversos locais dos lóbulos pulmonares, utilizando para o efeito um sistema de microscópico/fotografia acoplado ao computador. Na captação das imagens foi usada a ampliação de 400x e abertura do condensador entre 0,6-0,68 e o programa de fotografia Studio Lite ® 1.0, gravando a fotografia em formato TIFF com 16 milhões de definição.

As imagens foram aperfeiçoadas, para retirar alguns defeitos que resultam da técnica de coloração e para eliminar alguns resíduos tecidulares (ex: glóbulos vermelhos), o que foi realizado usando o programa Adobe Photoshop ® 6.0.

Seleccionámos 30 fotos por grupo e procedemos à quantificação da área septal e da área de fibras elásticas presente em cada imagem, através do programa Image ® J 1.36, e com estes resultados foi calculada a percentagem de fibras elásticas por área septal.

Para dar início ao processo de quantificação, a imagem inicial em formato TIFF 16 milhões (fig. 4a) foi convertida em imagem 8-bitt (fig.4b).

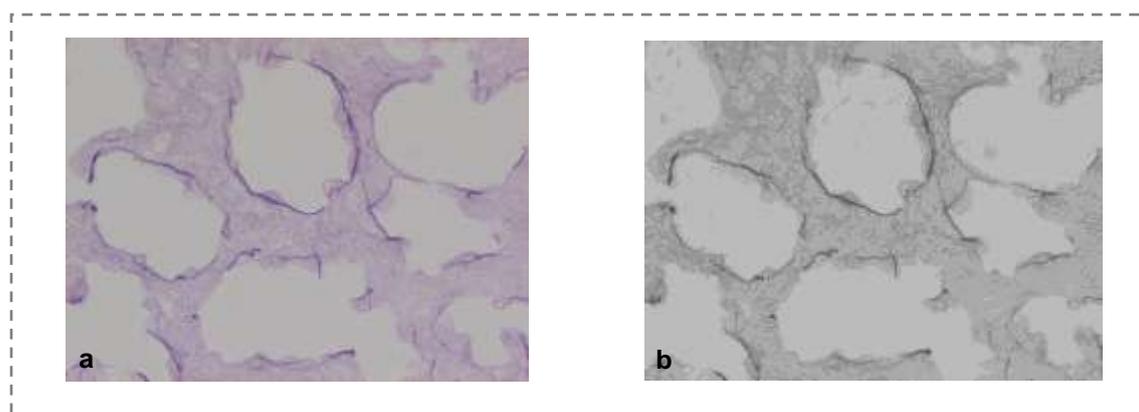


Figura 4. Conversão da imagem do pulmão fetal. Legenda: a – TIFF 16 milhões; b – 8-bitt.

Depois foi activado e ajustado o “limiar” (“threshold”) (fig. 5a), ordenando a sua aplicação, obtendo no final uma imagem com dois tons (fig. 5b). Usando o programa, mandámos quantificar as partículas existentes na imagem, e obtivemos a área total ocupada por essas partículas.

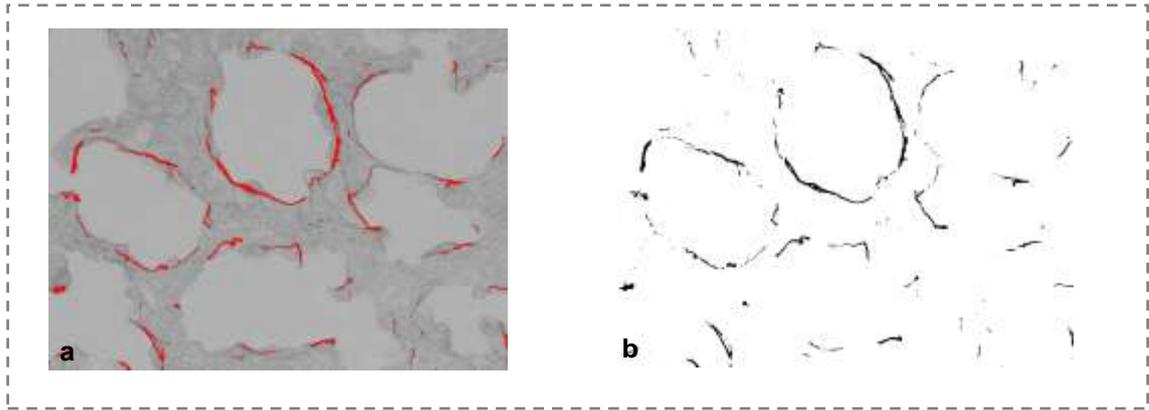


Figura 5. Activação e aplicação do “limiar” no pulmão fetal. Legenda: a – imagem antes de aplicação do “limiar”; b – imagem a dois tons.

### 2.2.3. Quantificação da elastina por HPLC

O método utilizado na quantificação da elastina presente nos pulmões fetais compreende a determinação do teor de desmosina e isodesmosina presente na amostra, o que foi realizado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), e a quantificação da proteína total, por espectrofotometria. O resultado final será expresso em pmoles de desmosina e isodesmosina por  $\mu\text{g}$  de proteína.

A análise de cada grupo foi realizada a um conjunto de amostras pulmonares, que compreendiam fetos pertencentes a pelo menos quatro ninhadas. De acordo com o dia de gestação o número de pulmões e o peso fresco por amostra foi variando dadas as diferentes dimensões pulmonares (tab. 1).

Tabela 1. Número e peso fresco dos pulmões fetais por grupo

<b>Grupo controlo</b>	<b>Grupo Vitamina A</b>
<b>F</b> (n=50; p=92 mg)	<b>F</b> (n=50 ; p=120 mg)
<b>M</b> (n=50; p=91 mg)	<b>M</b> (n=50; p=125 mg)
<b>15º dia</b>	
<b>F</b> (n=26; p=206 mg)	<b>F</b> (n=25; p=175 mg)
<b>M</b> (n=25; p=194 mg)	<b>M</b> (n=24; p=208 mg)
<b>16º dia</b>	
<b>F</b> (n=15; p=242 mg)	<b>F</b> (n=17; p=303 mg)
<b>M</b> (n=15); 267 mg	<b>M</b> (n=13; p=215,17 mg)
<b>17º dia</b>	
<b>F</b> (n=10; p=261,5 mg)	<b>F</b> (n=9; p=313,57 mg)
<b>M</b> (n=10; p=249,5 mg)	<b>M</b> (n=9; p=351,75 mg)
<b>18º dia</b>	
(n=9; p=283,2 mg)	<b>F</b> (n=8; p=280 mg) <b>F</b>
<b>19º dia</b>	
<b>M</b> (n=10; 310,8 mg)	<b>M</b> (n=9; p=259,9 mg)

Legenda: F- fêmeas; M- machos; n- número de pulmões fetais;  
p- peso fresco da amostra.

Deste modo descreveremos separadamente a técnica de HPLC e o método de quantificação da proteína total pulmonar.

## Procedimento

O processo de extracção e quantificação foi realizado de acordo com o método desenvolvido no Instituto de Histologia e Embriologia da FMUC (Rodrigues, 2003; Honório, 2007), havendo apenas pequenas modificações no que diz respeito á origem do material biológico e ao equipamento utilizado.

Os pulmões fetais de cada grupo, permaneceram congelados à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até ao início do procedimento, altura em que foram descongelados, sendo determinado o peso fresco por amostra. Na primeira fase, a de **extracção**, a amostra foi colocada num tubo de vidro (corex de 15ml) e adicionados 2ml de água destilada, seguindo-se uma breve homogeneização. Do homogeneizado anterior, foi retirado 1ml para posterior quantificação da proteína total, tendo sido congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ao restante (1ml), adicionámos 1ml de água destilada e 2ml de ácido tricloroacético a 10%, agitando a mistura e centrifugando a 9000g (ou seja, 10000 rpm) durante 10 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi desprezado e o resíduo tratado com 5ml de ácido tricloroacético a 5% durante 30 minutos á temperatura de  $+90^{\circ}\text{C}$ , para remoção do colagénio (Fitch et al, 1955). A amostra foi mantida à temperatura ambiente para arrefecer, sendo novamente centrifugada a 9000g durante 10 minutos.

O sobrenadante foi desprezado, e ao resíduo foram adicionados 2,5ml de acetona, sendo depois centrifugado a 9000g ( $4^{\circ}\text{C}$ ), durante 10 minutos, operação que foi repetida pelo menos mais uma vez. O resíduo foi a secar com vácuo a  $60^{\circ}\text{C}$ , para que no final desta fase, a amostra não apresentasse qualquer material lipídico.

Na fase seguinte, a **hidrólise da elastina**, o resíduo seco foi pesado e suspenso em 2ml de ácido clorídrico 6N, em ampola selada á chama, e colocado na estufa a  $120^{\circ}\text{C}$  onde permaneceu durante 48h. O mesmo procedimento foi utilizado para fazer a hidrólise de 2mg de elastina.

Para mais tarde estabelecermos a curva de calibração, foi necessário preparar uma solução padrão de desmosinas e isodesmosinas que foi sujeita ao tratamento de hidrólise. Assim, de uma alíquota da solução padrão de concentração de  $5\mu\text{mol/ml}$ , retirámos 100  $\mu\text{l}$ , aos quais adicionámos ácido clorídrico 6N, perfazendo um volume total de 2ml.

Na fase seguinte, de **purificação das desmosinas** em mini-colunas de celulose (Skinner, 1982), foram purificadas as soluções padrão, elastina e as amostras pulmonares fetais.

As ampolas foram retiradas da estufa, deixadas a arrefecer em ambiente escuro, sendo depois adicionados pela ordem enumerada os seguintes reagentes: 0,5ml de ácido acético, 0,5ml de fase estacionária e 2ml de n-butanol.

As colunas de purificação, consistiam em pipetas Pasteur de plástico em cujas extremidades inferiores colocámos um pouco de fibra de lã, a fim de reter o enchimento das colunas. Cada coluna foi preenchida com fase estacionária, aproximadamente 4cm, sendo depois adicionado 5ml de fase móvel.

A purificação teve início com a colocação, em cada coluna de celulose, de 2ml de fase móvel, seguida do conteúdo da ampola, 1,5ml de fase móvel com a qual se fez a lavagem da ampola e de mais 15ml de fase móvel. O solvente resultante destas passagens pela coluna foi totalmente desaproveitado. Em seguida, foi feita a eluição da coluna com 5ml de água ultrapura, recolhendo o filtrado para um tubo de ensaio. Foi retirado o n-butanol residual que se encontrava á superfície do tubo de ensaio, e as amostras foram congeladas. Procedeu-se à liofilização das amostras para remoção do ácido acético e do butanol utilizados durante o processo de purificação, processo que demorou aproximadamente 16 horas.

A próxima fase é a **derivatização**, um processo que consiste na introdução de um grupo químico numa determinada molécula, com o objectivo de a tornar mais facilmente detectável (Potter, 1995). Para formar derivados com as desmosinas com capacidade de absorção no ultravioleta, foi utilizado o cloreto de dansilo (DNS-Cl)– cloreto de 5-(dimetilamino) naftaleno-1-sulfonil. O método de derivatização pré-coluna (Guida et al, 1990), teve início com a dissolução das amostras liofilizadas em 1ml de ácido clorídrico 0,01N. Depois de uma breve agitação, foram retirados 100µl a cada uma das amostras, às quais adicionámos 100µl de hidrogenocarbonato de sódio 0,5M e 100µl da solução de cloreto de dansilo 20mM em acetona. A mescla anterior foi colocada na estufa a 65°C, durante 40 minutos e ao abrigo da luz e depois mantida a arrefecer no escuro à temperatura ambiente.

Á solução derivatizada, foi acrescentada uma mistura da fase móvel A e da fase móvel B na proporção de 70% de A e 30% de B, perfazendo o volume final de 3ml e ficando as amostras preparadas para a análise cromatográfica. De referir que a preparação destas duas fases móveis se encontra descrita no apêndice técnico.

A **análise cromatográfica** foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão, em fase reversa, utilizando um gradiente binário de 30%-60% de B,

durante 20 minutos, com fluxo constante de 1,2ml/min. Entre cada análise, o sistema foi equilibrado durante 10 minutos com fase móvel constituída por 70% de A e 30% de B, ficando o sistema preparado para uma nova determinação.

Para cada amostra derivatizada foram feitas três análises, com injeções de 100µl, o que corresponde ao “loop” do HPLC. O detector de ultravioleta foi programado para efectuar leituras a um comprimento de onda de 254nm, com uma sensibilidade ajustada a 0,001 aufs (absorbance unit full scale).

Na determinação quantitativa das desmosinas, recorreremos ao método do padrão externo, tendo sido estabelecida uma curva padrão de calibração (Guida et al, 1990). Esta curva, foi obtida a partir de injeções da solução padrão de desmosinas nas concentrações de 50 pmols/ml, 100 pmols e 250 pmols, sendo realizadas três análises por concentração.

### **Determinação da proteína total**

A quantificação da proteína total, foi realizada com o Kit Micro-Lowry Peterson's (Total protein kit, Micro-Lowry Peterson's modification - TP0300), cujo procedimento se baseia em duas reacções químicas. A primeira é a reacção do biureto, na qual o reagente tartarato cúprico alcalino, se complexa com as ligações peptídicas das proteínas, e a segunda é a redução do reagente Folin & Fenol de Ciocalteu, o que confere uma cor púrpura á solução.

O próximo passo para a determinação da proteína total foi a leitura da absorvância no espectrofotómetro, com comprimento de onda entre 500-800nm, o que com a curva de calibração pré-estabelecida, permitiu determinar a proteína total em cada amostra.

As amostras de pulmão fetal para a determinação da proteína total, correspondem a 1ml da amostra inicial usada na determinação da elastina por HPLC, e que apenas foi submetida a homogeneização em água destilada, tendo sido conservada no congelador (-20°C).

Começamos por preparar cinco tubos padrão, necessários para estabelecer a curva de calibração, diluindo a solução padrão de proteína do kit em água destilada, de modo a obter as concentrações finais respectivas de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/ml, num volume final de 1ml (tab. 2).

Tabela 2. Preparação das soluções padrão

<b>Solução de proteína (ml)</b>	<b>Água (ml)</b>	<b>Conc. Proteína (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
0,125	0,875	50
0,250	0,750	100
0,500	0,500	200
0,750	0,250	300
1	0	400

Ainda foi preparado o branco (1ml de água destilada), e a partir desta fase, as soluções padrão, branco e amostras, foram submetidas aos mesmos procedimentos.

Assim, começámos por adicionar 0,1ml de solução de desoxicolato de sódio a 0,15% (DOC) a todas as soluções, que depois de agitar, foram mantidas à temperatura ambiente durante 10 minutos. Adicionámos 0,1ml de ácido tricloroacético a 72% (TCA) e após mistura, procedemos à centrifugação a 10000 rpm durante 8 minutos. As soluções foram decantadas e o sobrenadante desprezado, dissolvendo os “pellets” em 0,1ml de reagente de Lowry. As soluções foram transferidas para tubos de ensaio e os tubos de centrifugação lavados com 1ml de água destilada, lavagem que foi colocada nos respectivos tubos de ensaio. Foram mantidas à temperatura ambiente durante 20 minutos, e depois foi adicionado o reagente de Folin & Fenol de Ciocalteu, que após 30 minutos confere cor às soluções.

A medição das absorvâncias foi realizada no espectrofotómetro, com comprimento de onda de 750nm, tendo sido feitas três leituras para cada padrão e cada amostra pulmonar. Iniciámos a leitura pelas soluções padrão para estabelecer a curva de calibração, e uma vez obtida a curva, fizemos a leitura das amostras, usando o branco como referência. Como os valores detectados nas amostras foram elevados, saindo da curva de calibração estabelecida, foi necessário diluir duas vezes todas as amostras pulmonares iniciais.

De referir que este método também foi utilizado para determinar a proteína total das amostras do estudo de quantificação do retinol e palmitato de retinilo (por HPLC) no fígado e pulmões fetais, que nesta fase da análise as amostras de fígado foram diluídas duas vezes e as amostras pulmonares apenas necessitaram de uma diluição.

#### **2.2.4. Quantificação do retinol e palmitato de retinilo no fígado e pulmão fetais**

Os pulmões e fígados fetais usados nesta análise, foram mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ao início do procedimento. Selecionámos fígados e pulmões de fetos de pelo menos quatro ninhadas diferentes, obtendo um peso fresco de amostra que variou entre 100-150 mg de fígado e 40-170 mg de pulmão, variação que resulta da dimensão dos fragmentos em cada dia de gestação.

O procedimento que decorreu de acordo com a metodologia desenvolvida no Instituto de Histologia e Embriologia de Coimbra (Rodrigues, 2003; Honório, 2007), foi igual para os dois órgãos e compreende um processo de extracção e quantificação por cromatografia líquida de alta pressão, e outro de quantificação das proteínas solúveis (já descrito anteriormente), sendo o resultado final expresso em ng de retinol ou palmitato de retinilo por  $\mu\text{g}$  de proteína solúvel existente na amostra.

#### **Extracção e quantificação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)**

A cada amostra inicial foram adicionados  $750\ \mu\text{l}$  de solução de padrão interno e 3ml da solução clorofórmio/metanol (proporção 2:1) contendo  $50\ \mu\text{g}$  de butil-hidroxitolueno. Após completa homogeneização da amostra, procedemos à centrifugação a 2000g, durante 10 minutos, e depois retirámos o sobrenadante, conservando o resíduo a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação das proteínas totais solúveis.

Retirámos 2 ml de sobrenadante e adicionámos  $400\ \mu\text{l}$  de cloreto de potássio a 0,37% p/v, que após mistura, foi centrifugado a 2000g, durante 5 minutos. A fase superior foi desprezada e a inferior foi evaporada em corrente de árgon.

O resíduo obtido foi diluído em 1 ml de solução de clorofórmio/metanol (proporção 1:1) e filtrado com filtros de porosidade  $0,2\ \mu\text{m}$ , ficando a amostra pronta para ser analisada.

De referir que todos estes procedimentos foram realizados ao abrigo da luz directa e que juntamente com cada amostra fetal foi preparada uma “amostra branco”, com a composição inicial de  $750\ \mu\text{l}$  de padrão interno e que foi submetida a todos os procedimentos da amostra fetal. A “amostra branco” assegurou-nos a

detecção de uma determinada concentração de retinol e palmitato de retinilo, que no final foi subtraída aos valores obtidos nas amostras fetais.

A separação cromatográfica foi realizada por HPLC, com eluição em sistema isocrático, sendo a quantificação do retinol e palmitato de retinilo efectuada por método de padrão interno, constituído por acetato de retinilo. A fase móvel foi constituída por metanol a 100% e a eluição efectuada com fluxo constante de 2,5 ml/min. O detector de ultravioleta foi programado para fazer leitura a 325nm de comprimento de onda, com sensibilidade de 0,002 aufs.

De cada amostra fetal e “branco” foram realizadas três análises, injectando 20µl por leitura. De referir que foi necessário estabelecer uma curva de padrão, e para tal foram preparadas três soluções de calibração, com o acetato de retinilo como padrão interno e com as seguintes concentrações: a) 0,2 µg/ml de retinol, 0,6 µg/ml de palmitato de retinilo e 1 µg/ml de acetato de retinilo; b) 1 µg/ml de retinol, 3 µg/ml de palmitato de retinilo e 1 µg/ml de acetato de retinilo; c) 4 µg/ml de retinol, 12 µg/ml de palmitato de retinilo e 1 µg/ml de acetato de retinilo.

### **2.2.5. Estudo Imunocitoquímico dos receptores de estrogénios (ER $\alpha$ e ER $\beta$ )**

As secções tecidulares com 5  $\mu$ m de espessura, foram colocadas em lâminas de vidro previamente revestidas com lisina, para evitar eventual perda dos fragmentos. Para pesquisar a presença e distribuição do receptor de estrogénios alfa (ER $\alpha$ ) e o receptor de estrogénios beta (ER $\beta$ ) no pulmão fetal, foram seleccionadas duas lâminas por grupo

A detecção do receptor ER $\alpha$  foi realizada de acordo com o sistema imunoenzimático estreptavidina-biotina/peroxidase, técnica que envolve a incubação sequencial de anticorpo primário não conjugado, anticorpo secundário biotilado, complexo estreptavidina-biotina e o cromogénio (Thermo Scientific, Labvision #TP-015-HD). O anticorpo ER $\alpha$  utilizado foi um monoclonal (SP1) de coelho, preparado numa solução azida de sódio 0,09% (Thermo Scientific, Labvision #RM-9101).

A detecção do receptor ER $\beta$  foi concretizada de acordo com o método imunocitoquímico de detecção com polímero, que consiste na incubação com anticorpo primário, seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado com polímero marcado com enzima e uso do cromogénio (Thermo Scientific, Labvision #TL-060-HLS). O anticorpo primário ER $\beta$  utilizado foi um policlonal de coelho preparado numa solução de PBS (10mM, pH 7.6), com BSA 2% e azida de sódio 15mM (Thermo Scientific, Labvision #RB-10658).

#### **Protocolo para a detecção do receptor alfa**

As secções tecidulares foram desparafinadas, hidratadas até à água e colocadas numa solução de peróxido de hidrogénio, durante 10 a 15 minutos, para bloquear ligações com a peroxidase endógena. Depois de duas lavagens com tampão TBS, as secções foram colocadas em tampão citrato a ferver (10mM e pH 6), durante 10-20 minutos, sendo retiradas e mantidas a arrefecer à temperatura ambiente (20 min.). Após quatro lavagens com TBS, aplicámos o “anti-block” (5 min.), para bloquear ligações inespecíficas. Depois da lavagem em TBS, as secções foram incubadas com o anticorpo primário (ER $\alpha$ ), na diluição de 1/100 durante 30 minutos, seguindo-se a incubação com “biotinylated goat anti

polivalent plus” (10 min.) e a incubação com “streptavidin peroxidase plus” (10 min.). Entre estas incubações, foram feitas lavagens em tampão TBS.

A reacção de coloração foi desencadeada com solução de DAB, durante 5 minutos e os núcleos evidenciados com hematoxilina. Depois fizemos a desidratação, diafanização e montagem definitiva das lâminas.

Incluimos o controlo negativo, no qual omitimos a aplicação do anticorpo primário ER $\alpha$  num corte histológico de pulmão fetal e o controlo positivo, com secções histológicas de cancro da mama tipo MCF-7, submetidas a todo o protocolo.

### **Protocolo para a detecção do receptor beta**

As secções foram desparafinadas, hidratadas até à água e lavadas em solução tampão PBS. Depois foram transferidas para uma solução tampão citrato a ferver (10mM e pH 6), durante 10-20 minutos e depois retiradas e mantidas a arrefecer á temperatura ambiente. Mais uma lavagem com PBS, seguida da imersão em peróxido de hidrogénio (10 a 15 min.) para bloquear a peroxidase endógena e por uma incubação com uma solução “Ultra V Block” (5 min.), para bloquear ligações inespecíficas. Seguiu-se a incubação com anticorpo primário (ER $\beta$ ) na diluição de 1/10, durante 60 minutos, a incubação com a solução “value primary antibody enhancer” (20 min.) e a aplicação do complexo “value HRP polymer” (30 min.). Entre as incubações procedemos a lavagens com PBS.

A solução DAB actuou durante 5 minutos para conferir a coloração pretendida, seguindo-se o contraste com hematoxilina, e assim as lâminas ficaram prontas para a fase final de desidratação, diafanização e montagem definitiva.

Incluimos o controlo negativo, no qual omitimos a aplicação do anticorpo primário ER $\beta$  num corte histológico do pulmão fetal e o controlo positivo, com secções histológicas de cancro da mama, submetidas a todo o protocolo.

### **Interpretação dos resultados**

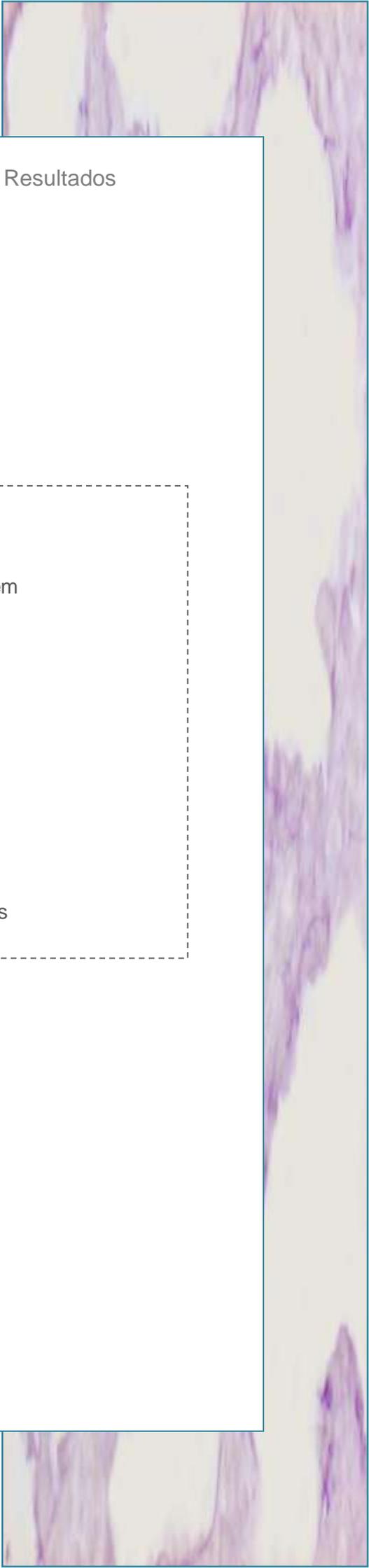
A positividade foi identificada pela observação de coloração de cor castanha nos núcleos das células do tecido pulmonar fetal e a intensidade da coloração foi classificada de acordo com a variação da tonalidade de castanho.

Ainda procedemos á determinação da percentagem de células com imunomarcacção, fazendo contagens celulares em seis fotografias por grupo

experimental, com ampliação 400x. A contagem foi realizada nas estruturas epiteliais com células positivas, sendo determinado o número total de células dessa estrutura e o número de células marcadas, a fim de obter uma percentagem de células imunomarcadas por imagem.

### **2.3. Análise estatística dos resultados**

Todos os resultados foram analisados com o programa StatView 5.0, tendo sido usada na comparação entre grupos o t-Test (paired) com valor estatisticamente significativo  $<0,0001$ .



## Resultados

- 3.1. Peso fetal durante a gestação
- 3.2. Determinação das fibras elásticas por análise de imagem
- 3.3. Quantificação da elastina por HPLC
- 3.4. Quantificação do retinol no pulmão fetal
- 3.5. Quantificação do palmitato de retinilo no pulmão fetal
- 3.6. Quantificação do retinol no fígado fetal
- 3.7. Quantificação do palmitato de retinilo no fígado fetal
- 3.8. Estudo imunocitoquímico dos receptores de estrogénios

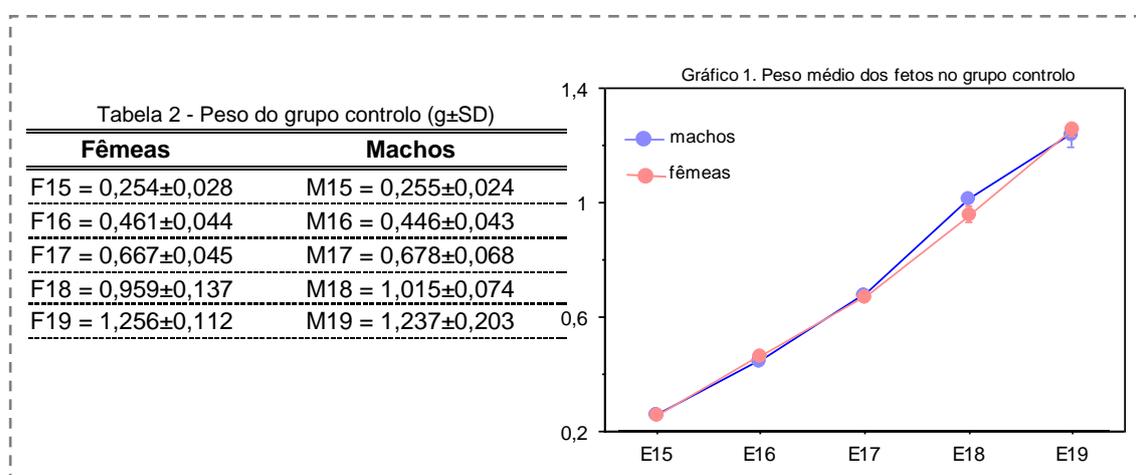
### 3.1. Peso fetal durante a gestação

De acordo com o observado, ao longo da gestação os grupos experimentais apresentaram um aumento progressivo do **peso dos fetos**. Em todos os grupos a maior percentagem de aumento de peso ocorreu do dia de gestação E15 para o dia E16, com aumento de peso corporal na ordem dos 181% nas fêmeas controlo e fêmeas com vitamina, enquanto nos machos controlo o aumento foi de 175% e nos machos com vitamina de 170%. À medida que a gestação avançou a percentagem de aumento de peso corporal foi sendo menor, observando-se no entanto um maior crescimento fetal (tab. 1).

Tabela 1- Percentagem de aumento de peso corporal ao longo da gestação no grupo controlo e vitamina A

	Fêmea controlo	Macho controlo	Fêmea Vit. A	Macho Vit. A
E15---E16	181,5%	174,9%	181,3%	170,7%
E16---E17	144,7%	152,0%	152,0%	159,8%
E17---E18	143,8%	149,7%	153,0%	144,5%
E18---E19	130,9%	121,9%	118,7%	127,3%

No **grupo controlo** o valor médio do peso dos fetos de ambos os géneros apresentou algumas diferenças ao longo dos cinco dias de gestação estudados. No dia E15 os fetos fêmeas apresentaram peso médio de 0,254g e os machos de 0,255g, enquanto no dia E16 o peso aumentou para 0,461g e 0,446g respectivamente. No dia E17 o peso médio das fêmeas foi de 0,667g e dos machos de 0,678g e no dia E18 um novo aumento para 0,959g, nas fêmeas, e para 1,015g nos machos. No dia E19 os fetos fêmeas pesaram 1,256g e os machos 1,237g (tab. 2/ graf. 1/).

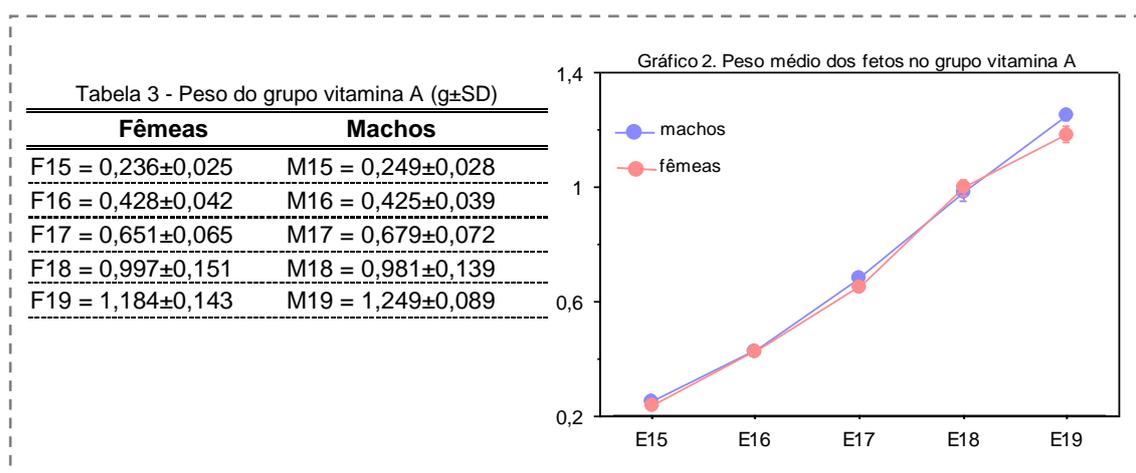


A comparação estatística entre géneros do grupo controlo, mostrou algumas diferenças de peso, no entanto estas não foram estatisticamente significativas nos dias de gestação estudados (quadro 1).

Quadro 1- Análise estatística comparativa do peso médio das fêmeas (Fc) e dos machos (Mc) controlo.

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	p value				
<b>Mc vs Fc</b>	0,9365	0,0849	0,3476	0,0849	0,6920

No **grupo com vitamina A** o valor médio do peso dos fetos de ambos os géneros foi aumentando ao longo dos cinco dias de gestação estudados. No dia E15 as fêmeas apresentaram um peso médio de 0,236g e os machos de 0,249g, aumentando no dia E16 para 0,428g e 0,425g respectivamente. No dia E17 o peso médio das fêmeas foi de 0,651g e dos machos de 0,679g, com novo aumento no dia E18 para 0,997g nas fêmeas, e para 0,981g nos machos. No dia E19 os fetos fêmeas pesaram 1,184g e os machos 1,249g (tab.3/ graf. 2).



A comparação estatística entre géneros do grupo com vitamina A, evidencia algumas diferenças de peso, no entanto em todos os dias de gestação, não foram estatisticamente significativas (quadro 2).

Quadro 2- Análise estatística comparativa do peso médio das fêmeas (Fa) e dos machos (Ma) vitamina A.

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	p value				
<b>Ma vs Fa</b>	0,0062	0,6684	0,1239	0,5459	0,0662

Quando realizámos a comparação entre fêmeas controlo e fêmeas com vitamina A não se observaram diferenças estatisticamente significativas, o mesmo acontecendo na comparação entre machos controlo e machos com vitamina.

Quando relacionamos a diferença de peso entre géneros do grupo controlo com a diferença entre os géneros do grupo com vitamina A, foi possível verificar que dependendo do dia de gestação, esta diferença aumentou ou ficou mais reduzida nos fetos com vitamina A (graf. 3/ tab.4). Nos dias E15, E17 e E19 a diferença de peso entre géneros foi maior no grupo com vitamina A de que no grupo controlo, enquanto nos dias E16 e E18 a diferença foi menor (graf. 3/ tab.4).

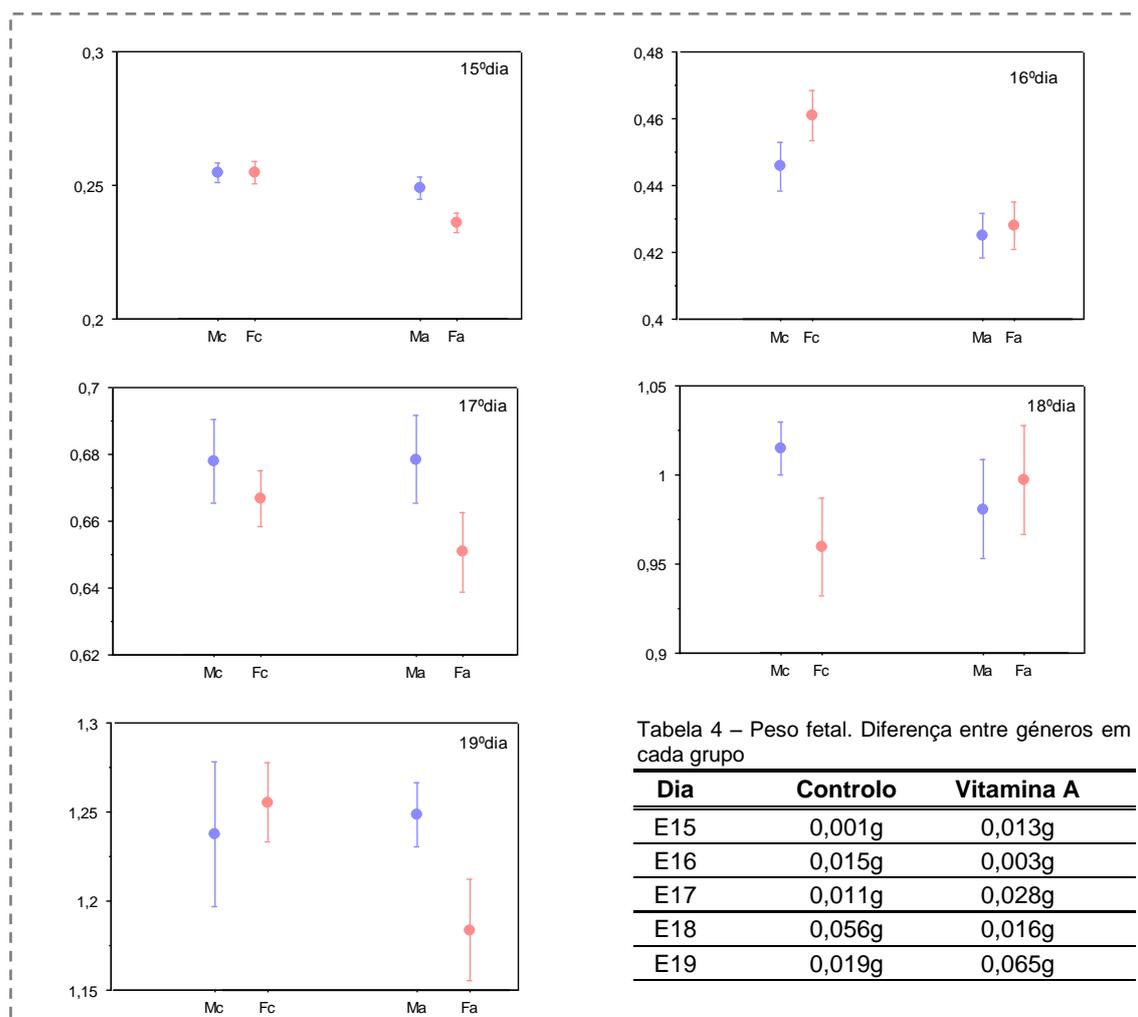


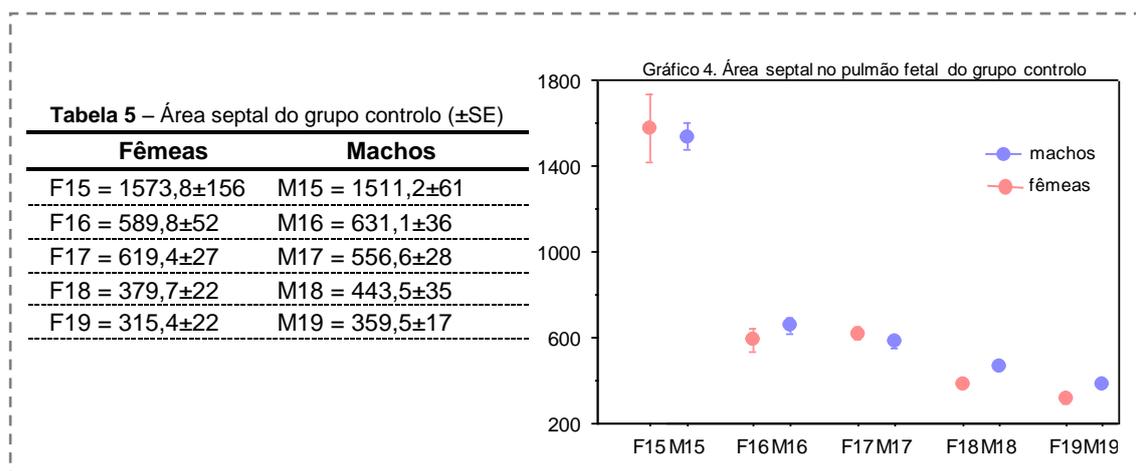
Tabela 4 – Peso fetal. Diferença entre géneros em cada grupo

Dia	Controlo	Vitamina A
E15	0,001g	0,013g
E16	0,015g	0,003g
E17	0,011g	0,028g
E18	0,056g	0,016g
E19	0,019g	0,065g

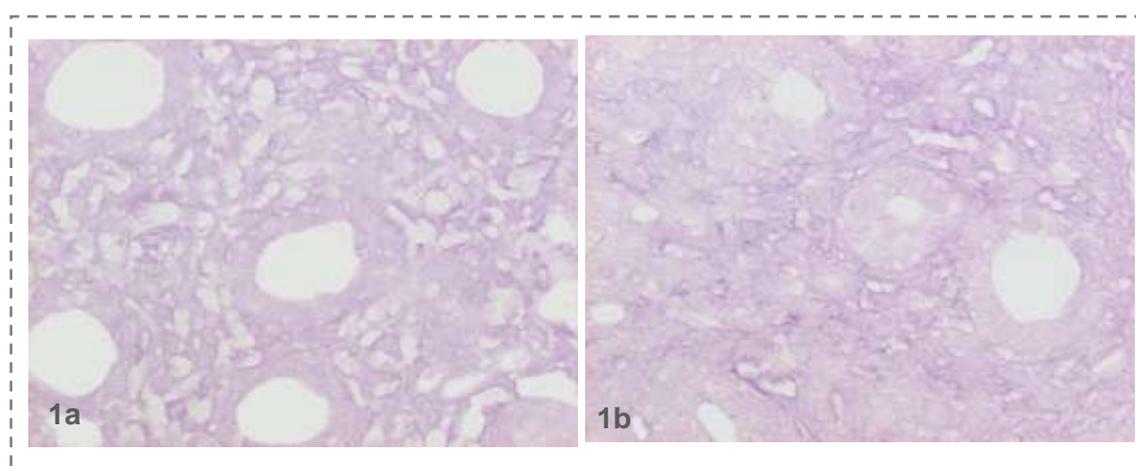
Gráfico 3. Pesos médios (g±SE) de cada grupo nos dias de gestação E15, E16, E17, E18 e E19. Legenda: Mc- machos controlo; Fc- fêmeas controlo; Ma- machos vitamina A; Fa- fêmeas vitamina A.

### 3.2. Determinação das fibras elásticas por análise de imagem

Nos pulmões fetais de ambos os gêneros do **grupo controle**, foi possível verificar que a **área septal** diminui ao longo da gestação (tab. 5/ graf.4). O valor médio da área septal no dia de gestação E15 foi de 1573,83 nas fêmeas e de 1511,22 nos machos, descendo acentuadamente no dia E16 para valores de 589,83 nas fêmeas e de 631,15 nos machos (fotog. 1).



No dia E17, observamos um ligeiro aumento nas fêmeas, com valor médio de 619,42 e uma ligeira diminuição nos machos, para 556,69. No dia E18 a área septal voltou a diminuir para 379,72 nas fêmeas e 443,53 nos machos, tendência que se acentuou no dia de gestação E19, onde o valor de área septal nas fêmeas foi de 315,44 e nos machos de 359,52 (tab. 5/ graf.4).



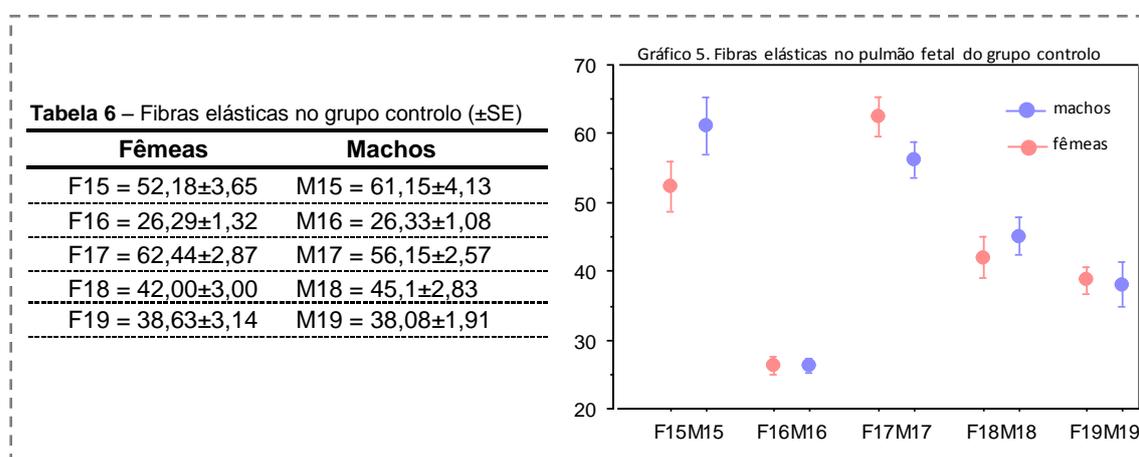
Fotografia 1. Pulmão fetal das fêmeas (1a) e machos controle (1b) no dia de gestação E16 (400X; fib. elást.).

Em relação à área septal, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre gêneros no grupo controle, durante os cinco dias de gestação estudados (quadro 3).

Quadro 3 - Análise estatística comparativa da área septal nas fêmeas (Fc) e machos (Mc) controlo.

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif. / p value				
<b>Mc vs Fc</b>	62, 616 / 0,7316	41,325 / 0,5266	- 62,725 / 0,0881	63,809 / 0,0114	44,079 / 0,0983

Nos pulmões das fêmeas controlo, os valores médios determinados para as **fibras elásticas** variaram ao longo da gestação, sendo o valor médio de 52,2 no dia de gestação E15, 26,3 no dia E16, 62,4 no dia E17, 42,0 no dia E18 e de 38,6 no dia E19. Nos machos também foram observadas variações semelhantes, sendo os valores de 61,1 no dia E15, 26,3 no dia E16, 56,1 no dia E17, 45,1 no dia E18 e de 38,1 no dia E19 (tab. 6/graf. 5).



Não existiram diferenças estatisticamente significativas na quantidade de fibras elásticas entre géneros do grupo controlo (quadro 4).

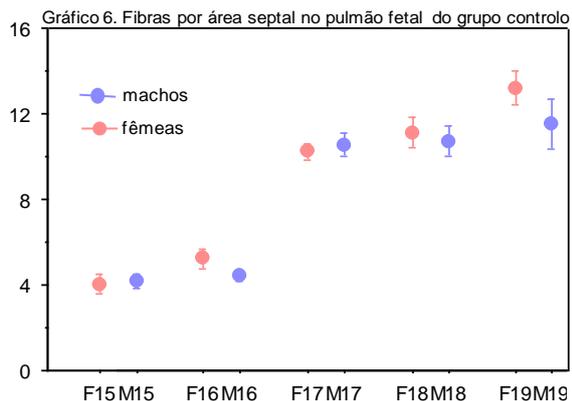
Quadro 4 - Análise estatística comparativa do teor de fibras nas fêmeas (Fc) e machos (Mc) controlo.

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif. / p value				
<b>Mc vs Fc</b>	8,968 / 0,0155	0,034 / 0,9850	- 6,295 / 0,0882	3,103 / 0,4771	-0,550 / 0,8613

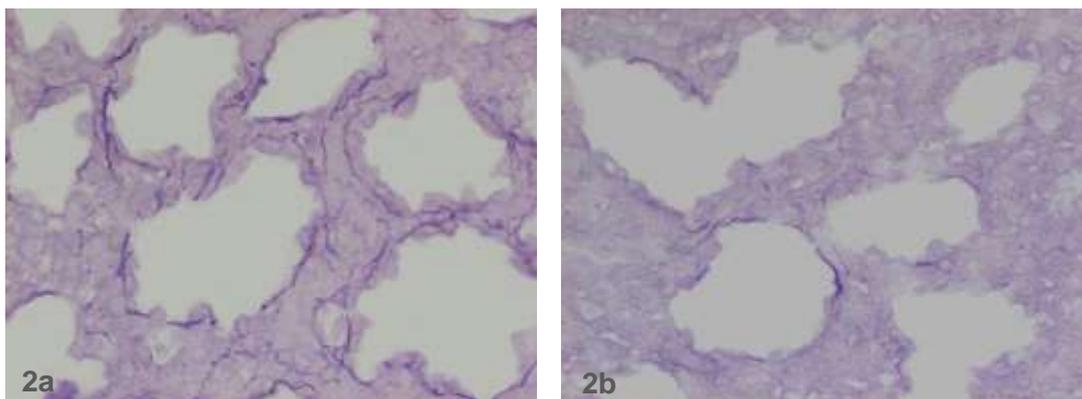
Com exceção do dia E18, onde os machos mantiveram um valor semelhante ao do dia E17, a **percentagem média de fibras elásticas por área septal** em ambos os géneros do grupo controlo, aumentou ao longo da gestação (tab. 7 /graf. 6). As fêmeas controlo apresentaram 4% de fibras no dia E15, 5,2% no dia E16, 10,2% no dia E17, 11,1% no dia E18 e de 13,2% no dia E19 (fotog. 2a).

**Tabela 7** – % de fibras por área septal no grupo controle ( $\pm$ SE)

Fêmeas	Machos
F15 = $4 \pm 0,46$	M15 = $4,18 \pm 0,32$
F16 = $5,23 \pm 0,45$	M16 = $4,41 \pm 0,21$
F17 = $10,22 \pm 0,36$	M17 = $10,54 \pm 0,55$
F18 = $11,11 \pm 0,68$	M18 = $10,67 \pm 0,71$
F19 = $13,2 \pm 0,78$	M19 = $11,5 \pm 1,2$



Nos machos os valores foram de 4,2% no dia E15, 4,4% no dia E16, 10,5% no dia E17, 10,7% no dia E18 e de 11,5% no dia E19 (fotog. 2b).



Fotografia 2. Pulmão fetal das fêmeas (2a) e machos controle (2b) no dia de gestação E19 (400X; fib. elást.).

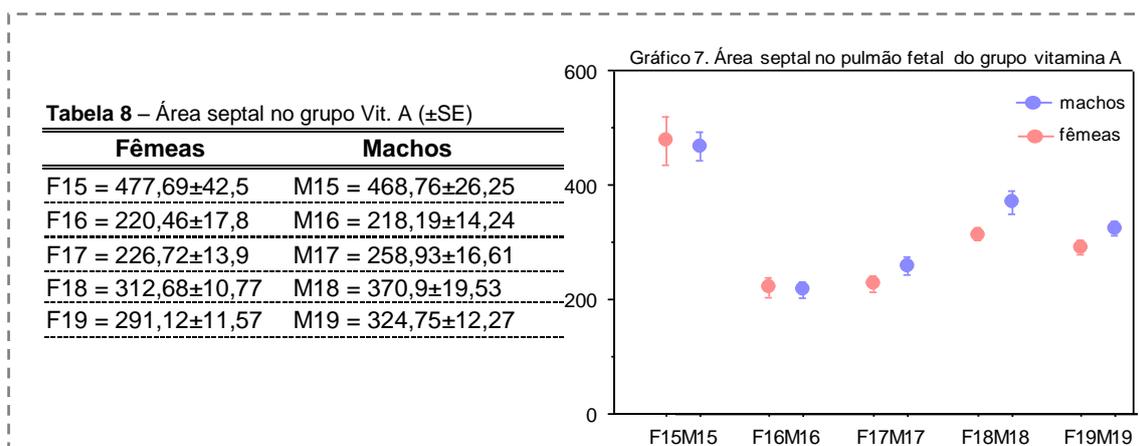
A análise estatística comparativa não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os géneros do grupo controle, no que diz respeito à percentagem de fibras elásticas por área septal (quadro 5).

Quadro 5 - Análise estatística comparativa da percentagem de fibras elásticas por área septal entre machos (Mc) e fêmeas (Fc) controle.

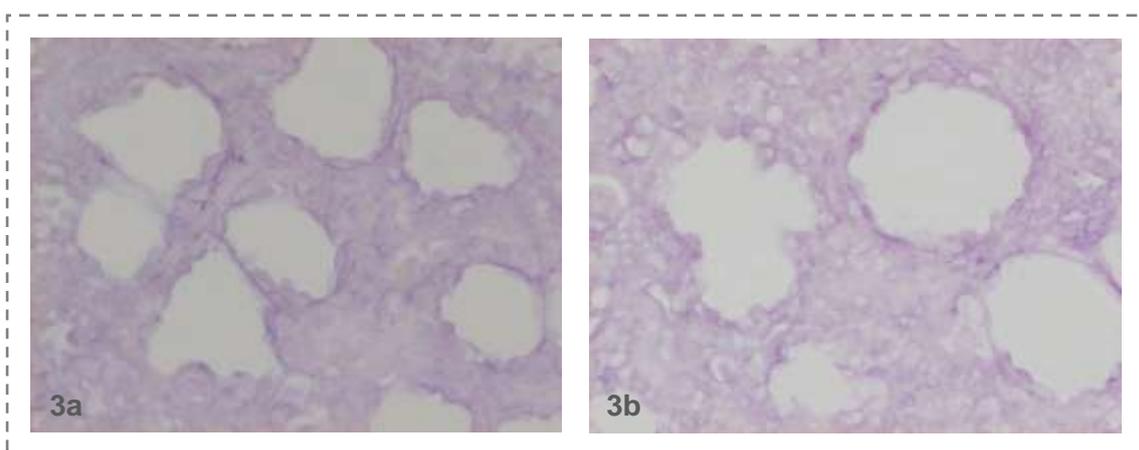
Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value				
<b>Mc vs Fc</b>	0,161 / 0,7875	-0,825 / 0,0992	0,321 / 0,6635	-0,438 / 0,6515	-1,695 / 0,2041

Nos pulmões fetais de ambos os géneros do **grupo com vitamina A**, a **área septal** diminuiu durante a gestação, com excepção do dia E18. A área septal

média no dia de gestação E15 foi de 477,7 nas fêmeas e 468,8 nos machos, descendo acentuadamente no dia E16 para valores de 220,5 e 218,2 respectivamente (tab.8/ graf. 7).



No dia E17, a área septal determinada foi semelhante, sendo de 226,7 nas fêmeas e 258,9 nos machos, no entanto, no dia E18 foi observado um aumento para valores de 312,7 nas fêmeas e 370,9 nos machos (fotog. 3). No dia E19 a área septal desceu para valores médios de 291,1 nas fêmeas e de 324,7 nos machos (tab.8/ graf. 7).



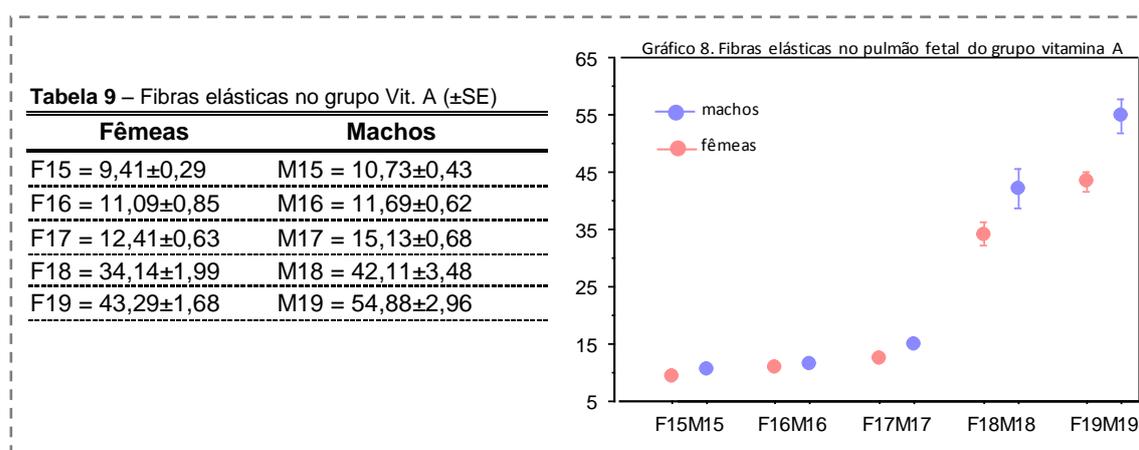
Fotografia 3. Pulmão fetal das fêmeas (3a) e machos com vitamina A (3b) no dia de gestação E18 (400X; fib. elást.).

Em relação à área septal não existiram diferenças estatisticamente significativas entre gêneros no grupo com vitamina A durante os cinco dias de gestação estudados (quadro 6).

Quadro 6 - Análise estatística comparativa da área septal nas fêmeas (Fa) e machos (Ma) vitamina A.

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif. / p value				
<b>Ma vs Fa</b>	-8,937 / 0,0062	-2,273 / 0,9263	32,210 / 0,1378	58,217 / 0,0131	-33,626 / 0,0409

Nos pulmões das fêmeas com vitamina A os valores médios determinados para as **fibras elásticas** aumentaram ao longo da gestação, sendo de 9,4 no dia E15, 11,1 no dia E16, 12,4 no dia E17, 34,1 no dia E18 e de 43,3 no dia E19. Nos machos, também foram observados valores crescentes durante os cinco dias estudados, sendo de 10,7 no dia E15, 11,7 no dia E16, 15,1 no dia E17, 42,1 no dia E18 e de 54,9 no dia E19 (tab. 9/graf. 8).

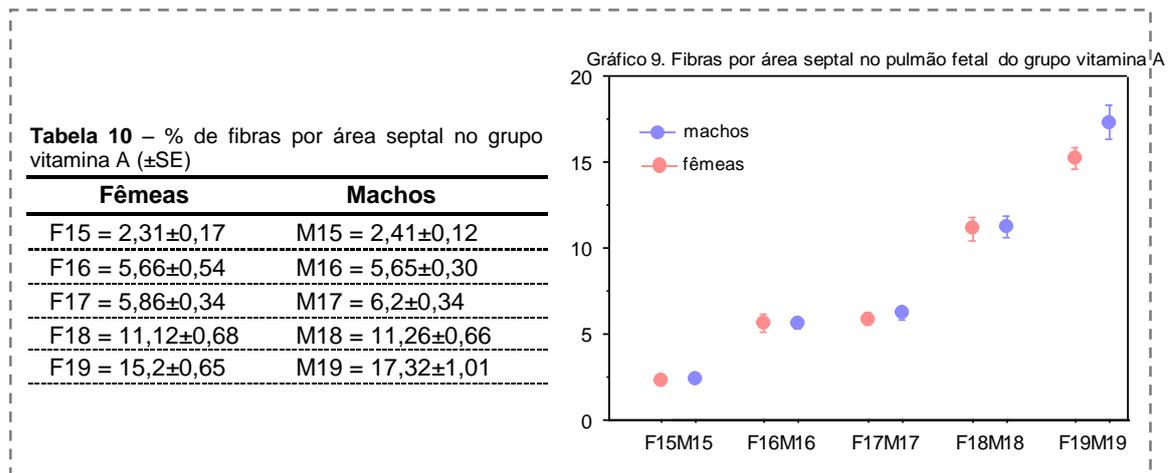


Não existiram diferenças estatisticamente significativas entre os gêneros no grupo com vitamina A, no que diz respeito ao conteúdo de fibras elásticas (quadro 7).

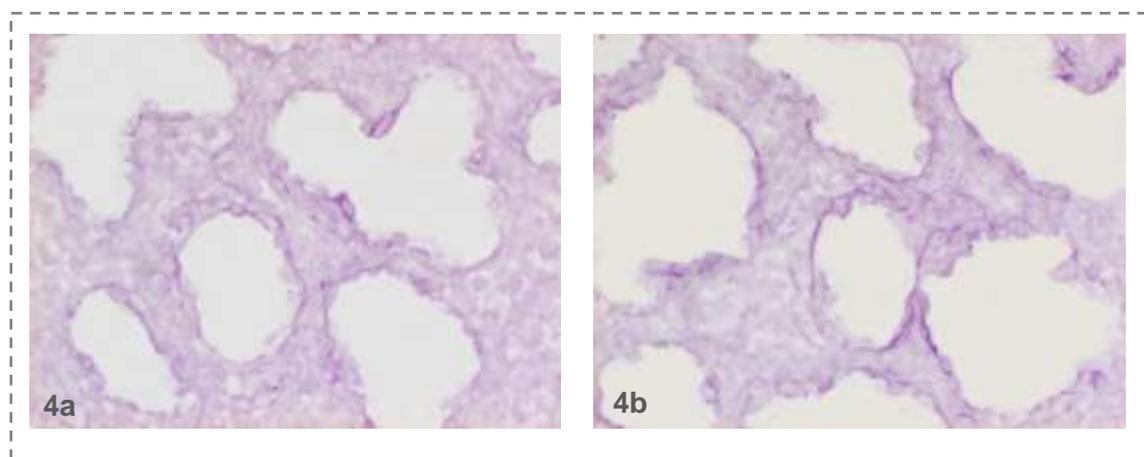
Quadro 7 - Análise estatística comparativa do teor de fibras elásticas nas fêmeas (Fa) e machos (Ma) vitamina A.

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif. / p value				
<b>Ma vs Fa</b>	1,326 / 0,0285	0,596 / 0,6027	2,727 / 0,0021	7,970 / 0,0664	11,591 / 0,0016

Com exceção do dia E17, onde ambos os gêneros apresentaram valores semelhantes ao dia E16, a percentagem **de fibras elásticas por área septal** em ambos os gêneros do grupo com vitamina A, aumentou ao longo da gestação (tab. 10/ graf. 9). As fêmeas com vitamina A apresentaram 2,3% de fibras no dia E15, 5,7% no dia E16, 5,9% no dia E17, 11,1% no dia E18 e de 15,2% no dia E19 (fotog. 4a).



Nos machos os valores determinados foram de 2,4% no dia E15, 5,6% no dia E16, 6,2% no dia E17, 11,3% no dia E18 e de 17,3% no dia E19 (fotg.4b).



Fotografia 4. Pulmão fetal das fêmeas (4a) e machos com vitamina A (4b) no dia de gestação E19 (400X; fib. elást.).

A análise estatística comparativa não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre gêneros no grupo com vitamina A, em relação à percentagem de fibras elásticas por área septal (quadro 8).

Quadro 8 - Análise estatística comparativa da percentagem de fibras elásticas por área septal entre machos (Ma) e fêmeas (Fa) vitamina A.

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif. / p value				
<b>Ma vs Fa</b>	0,098 / 0,6327	-0,004 / 0,9951	0,343 / 0,4243	0,135 / 0,9062	2,115 / 0,0573

O estudo comparativo **entre as fêmeas do grupo controlo e fêmeas com vitamina A**, permitiu verificar que as fêmeas do grupo controlo apresentaram uma **área septal pulmonar** maior que as fêmeas com vitamina, em todos os cinco dias de gestação estudados (graf. 10).

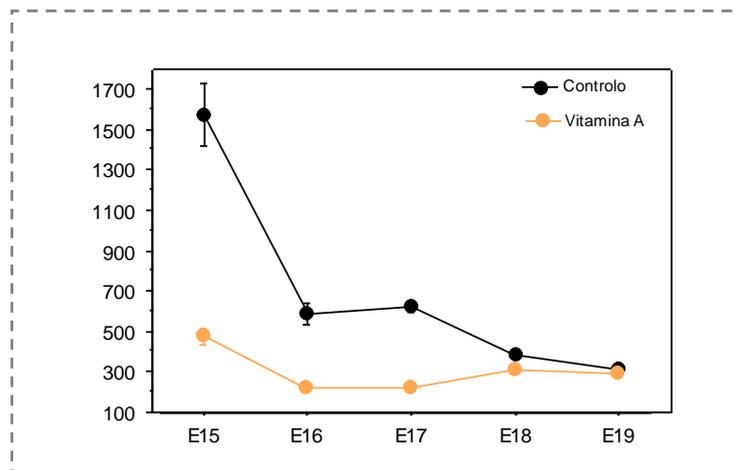


Gráfico 10. Valor médio da área septal ao longo da gestação nas fêmeas controlo e vitamina A (média±SE).

A análise estatística comparativa mostrou diferenças estatisticamente significativas nos dias de gestação E15, E16 e E17. Nos dias de gestação E18 e E19 as áreas septais aproximam-se, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre grupos (quadro 9).

Quadro 9. Análise estatística comparativa da área septal entre fêmeas controlo (Fc) e vitamina A (Fa).

Grupo vs grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Fc vs Fa</b>	<b>1096,13 / &lt;0,0001</b>	<b>369,36 / &lt;0,0001</b>	<b>392,69 / &lt;0,0001</b>	67,034 / 0,009	24,317 / 0,3734

O estudo comparativo **da área septal pulmonar entre os machos do grupo controlo e machos com vitamina A**, possibilitou verificar que em qualquer dia de gestação, os machos do grupo controlo apresentaram uma área septal maior que os machos do grupo com vitamina (graf. 11).

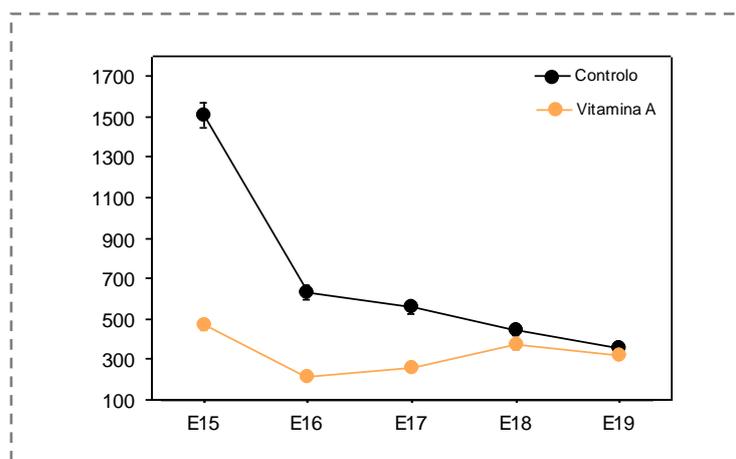


Gráfico 11. Valor médio da área septal ao longo da gestação nos machos controlo e vitamina A (média±SE).

A análise estatística comparativa das diferenças observadas entre os machos do grupo controlo e com vitamina A, foram estatisticamente significativas nos dias E15, E16 e E17, mas nos restantes dois dias de gestação, houve uma aproximação dos valores médios da área septal pulmonar (quadro 10).

Quadro 10. Análise estatística comparativa da área septal entre machos controlo (Mc) e vitamina A (Ma).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Mc vs Ma</b>	<b>1042,45 / &lt;0,0001</b>	<b>412,963 / &lt;0,0001</b>	<b>297,764 / &lt;0,0001</b>	72,626 / 0,009	34,77 / 0,132

O estudo comparativo **entre as fêmeas do grupo controlo e fêmeas com vitamina A**, permitiu verificar que as fêmeas do grupo controlo apresentaram mais fibras elásticas que as fêmeas com vitamina entre os dias de gestação E15 e E18. No dia E19 houve uma alteração, passando as fêmeas com vitamina a apresentarem mais fibras que as do grupo controlo (graf. 12).

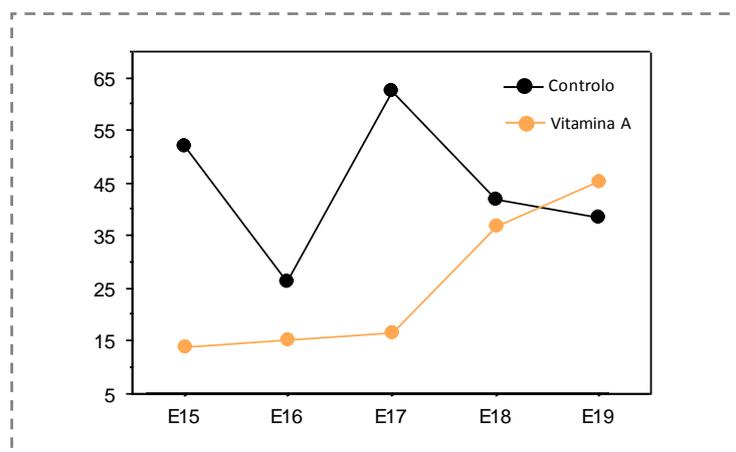


Gráfico 12. Valor médio das fibras elásticas ao longo da gestação nas fêmeas controlo e vitamina A (média±SE).

A análise estatística comparativa mostrou diferenças estatisticamente significativas apenas nos dias de gestação E15, E16 e E17. (quadro 11).

Quadro 11. Análise estatística comparativa das fibras elásticas entre fêmeas controlo (Fc) e vitamina A (Fa).

Grupo vs grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Fc vs Fa</b>	<b>42,77 / &lt;0,0001</b>	<b>15,20 / &lt;0,0001</b>	<b>50,04 / &lt;0,0001</b>	7,86 / 0,0569	-4,65 / 0,0983

O estudo comparativo **entre os machos do grupo controlo e machos com vitamina A**, permitiu verificar que os machos do grupo controlo apresentaram mais fibras elásticas que os machos com vitamina entre os dias de gestação E15 e E18. No dia E19 houve uma alteração, passando os machos com vitamina a apresentarem mais fibras que os do grupo controlo (graf. 13).

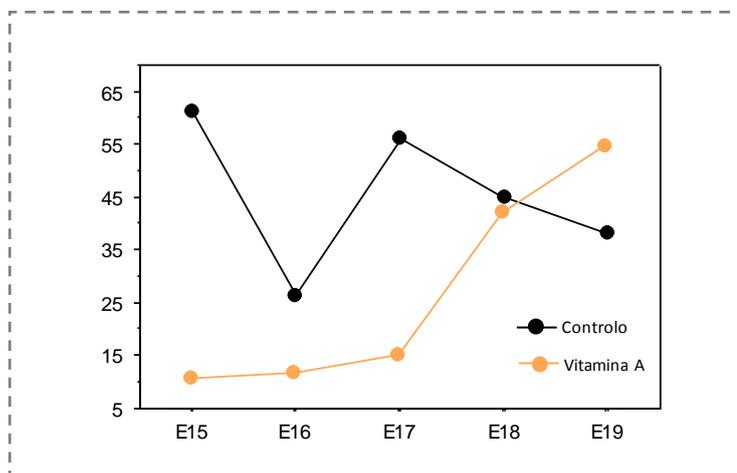


Gráfico 13. Valor médio das fibras elásticas ao longo da gestação nos machos controlo e vitamina A (média±SE).

A análise estatística comparativa mostrou diferenças estatisticamente significativas nos dias de gestação E15, E16, E17 e E19. (quadro 12).

Quadro 12. Análise estatística comparativa das fibras elásticas entre machos controlo (Mc) e vitamina A (Ma).

Grupo vs grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Mc vs Ma</b>	<b>50,41 / &lt;0,0001</b>	<b>14,64 / &lt;0,0001</b>	<b>41,01 / &lt;0,0001</b>	2,99 / 0,4399	<b>-16,79 / &lt;0,0001</b>

O estudo comparativo da **percentagem de fibras elásticas por área septal entre as fêmeas controlo e fêmeas com vitamina A**, mostrou grandes variações entre os grupos ao longo da gestação (graf. 14).

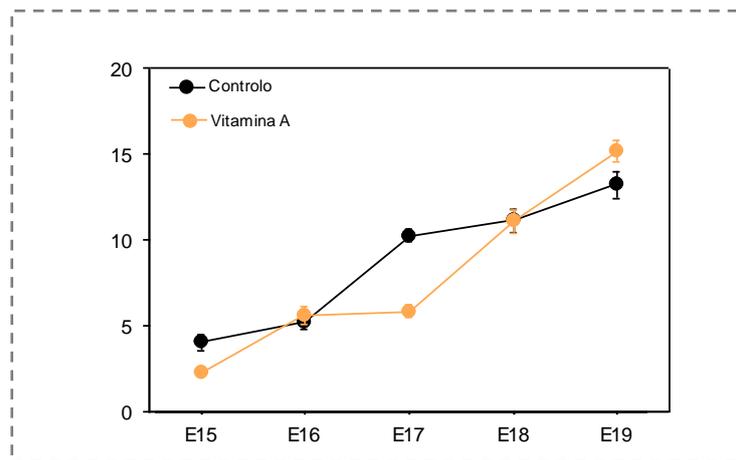
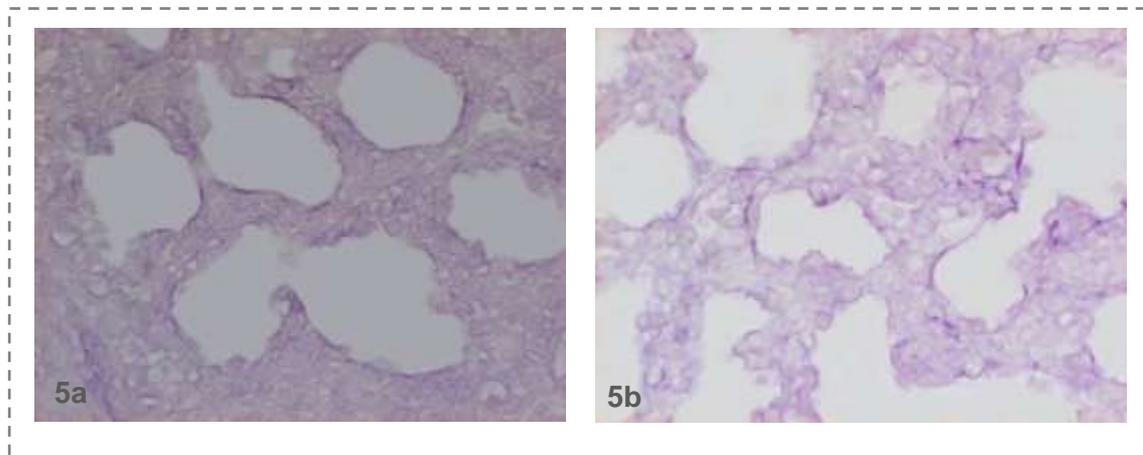


Gráfico 14. Valor médio da percentagem de fibras elásticas por área septal ao longo da gestação nas fêmeas controlo e vitamina A (média±SE).

Nos dias E16 e E18 a percentagem de fibras elásticas foi semelhante nas fêmeas dos dois grupos experimentais e, nos dias E15 e E17, o teor de fibras elásticas nas fêmeas do grupo controlo foi superior ao das fêmeas do grupo com vitamina A, mas apenas no dia E17 a diferença foi estatisticamente significativa (quadro 13).



Fotografia 5. Pulmão fetal das fêmeas controlo (5a) e fêmeas com vitamina A (5b) no dia de gestação E19 (400X; fib. elást.).

No dia E19 a percentagem de fibras elásticas nas fêmeas com vitamina foi superior (fotog. 5), no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa (quadro 13).

Quadro 13. Análise estatística comparativa da percentagem de fibras por área septal entre fêmeas controlo (Fc) e vitamina A (Fa).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Fc vs Fa</b>	1,709 / 0,0005	-0,423 / 0,5802	<b>4,358 / &lt;0,0001</b>	-0013 / 0,9910	-2,004 / 0,0883

O estudo comparativo da **percentagem de fibras elásticas por área septal entre os machos controlo e machos com vitamina A**, permitiu verificar que as diferenças no teor de fibras variou ao longo da gestação, no entanto, no dia E18 o conteúdo em fibras nos dois grupos foi muito semelhante (graf. 15).

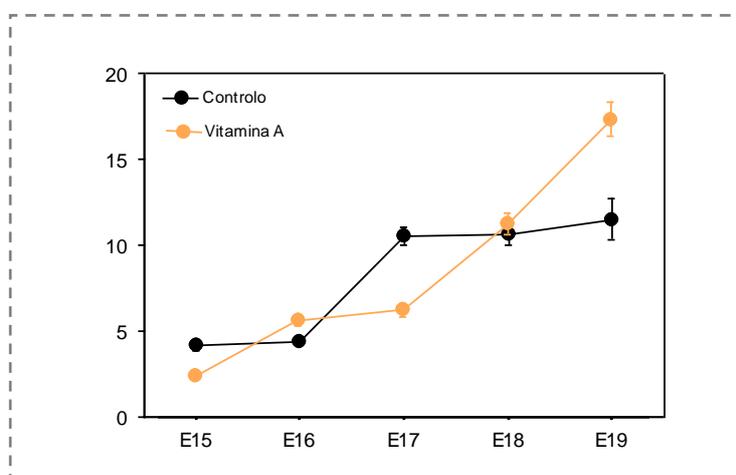
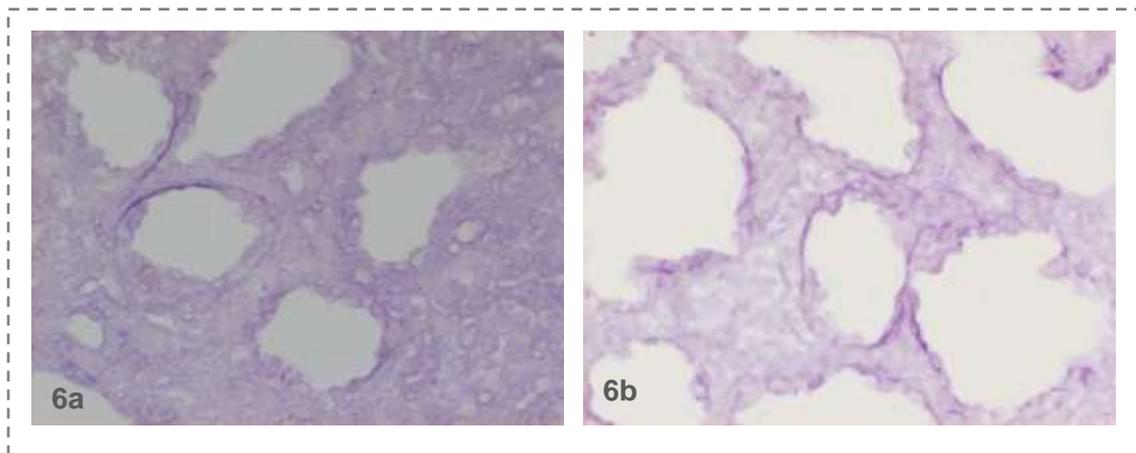


Gráfico 15. Valor médio da percentagem de fibras por área septal ao longo da gestação nos machos controlo e vitamina A (média±SE).

No dia E15 os machos controlo apresentaram um valor superior e no dia E16 observou-se o contrário, isto é, mais fibras nos machos com vitamina. No entanto nenhuma destas diferenças foi estatisticamente significativa (quadro 14).

Quadro 14. Análise estatística comparativa da percentagem de fibras elásticas por área septal entre machos controlo (Mc) e vitamina A (Ma).

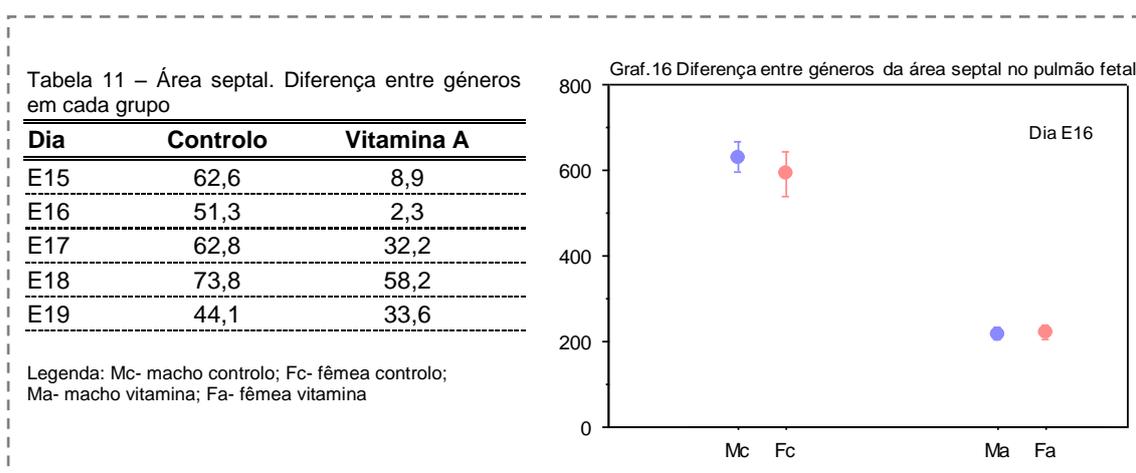
Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Mc vs Ma</b>	1,772/ 0,0001	-1,244/ 0,0036	<b>4,336/ &lt;0,0001</b>	-0,586/ 0,4974	-5,814/ 0,0003



Fotografia 6. Pulmão fetal dos machos controlo (6a) e machos com vitamina A (6b) no dia de gestação E19 (400X; fib. elást.).

No dia E17 a percentagem de fibras nos machos controlo, foi superior à dos machos com vitamina e no dia E19, os machos com vitamina apresentaram mais fibras que os do grupo controlo (fotog.6). No que diz respeito a estas diferenças, apenas o dia E17 teve valor estatisticamente significativo (quadro 14).

Quando relacionámos a **diferença da área septal entre géneros do grupo controlo com a diferença entre géneros do grupo com vitamina A**, foi possível verificar que, durante os dias de gestação estudados, a diferença foi sempre menor no grupo com vitamina A (tab. 11). De referir que esta redução foi mais expressiva nos dias de gestação E15, E16 (graf. 16) e E17.



Quando relacionámos a **diferença da percentagem de fibras elásticas entre géneros do grupo controlo com a diferença entre géneros do grupo com vitamina A**, foi possível verificar que, nos dias de gestação E16 e E18 houve uma redução da diferença entre géneros no grupo com vitamina A (tab.

12/graf.17). Nos dias E15 e E17 pouca diferença existe entre grupos, mas no dia E19 essa diferença foi maior no grupo com vitamina A (tab. 12/graf.17).

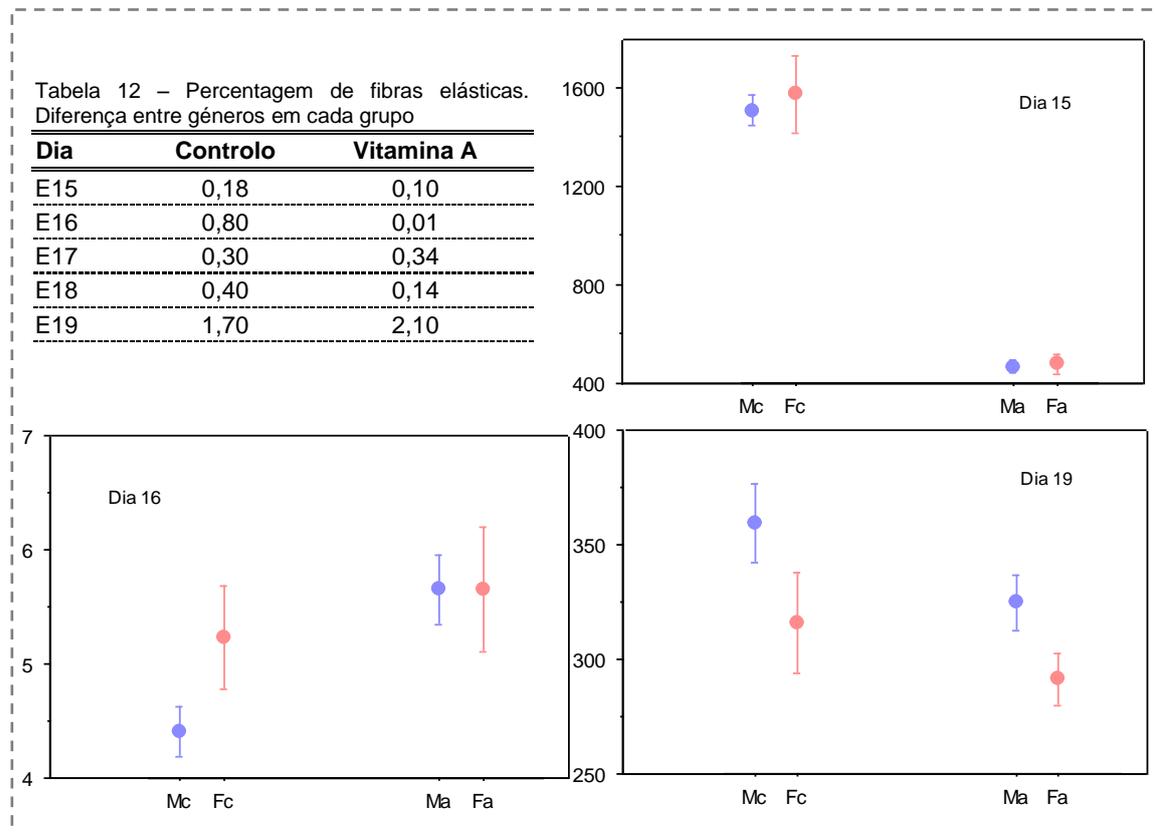
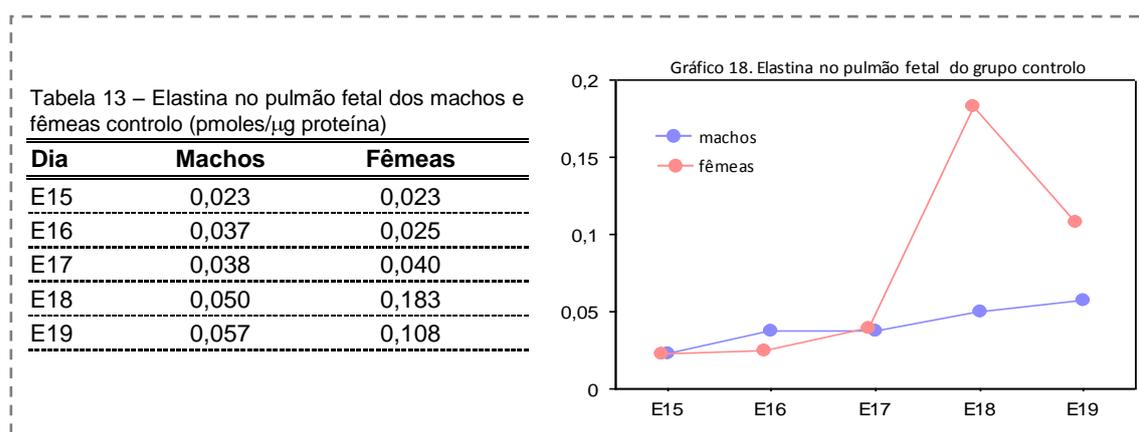


Gráfico 17. Percentagem de fibras elásticas por área septal (valor médio±SE) de cada grupo nos dias de gestação E15, E16 e E19. Legenda: Mc- machos controlo; Fc- fêmeas controlo; Ma- machos vitamina A; Fa- fêmeas vitamina A.

### 3.3. Quantificação da elastina por HPLC

O conteúdo de elastina nos pulmões fetais, que relembro foi determinado indirectamente através da quantificação de desmosina e isodesmosina, nos **machos controlo** foi aumentando ao longo da gestação, enquanto nas **fêmeas controlo** o aumento foi observado entre os dias de gestação E15 e E18, diminuindo no dia E19 (tab. 13/graf. 18). No dia E15 o teor de elastina das fêmeas foi de 0,023 pmoles, no dia E16 de 0,025 pmoles, observando-se uma ligeira subida no dia E17, para 0,040 pmoles. No dia E18 ocorreu um aumento acentuado de elastina, para 0,183 pmoles, descendo no dia E19 para 0,108 pmoles (tab. 13/graf. 18). Nos machos o aumento de elastina foi progressivo, sendo mais acentuado entre os dias de gestação E15-E16 e E17-E18. Assim, no dia E15 o teor de elastina foi de 0,023 pmoles, no dia E16 de 0,037 pmoles e no dia E17 de 0,038 pmoles. Aumentou para 0,050 pmoles no dia E18 e para 0,057 pmoles no dia E19 (tab. 13/graf. 18).

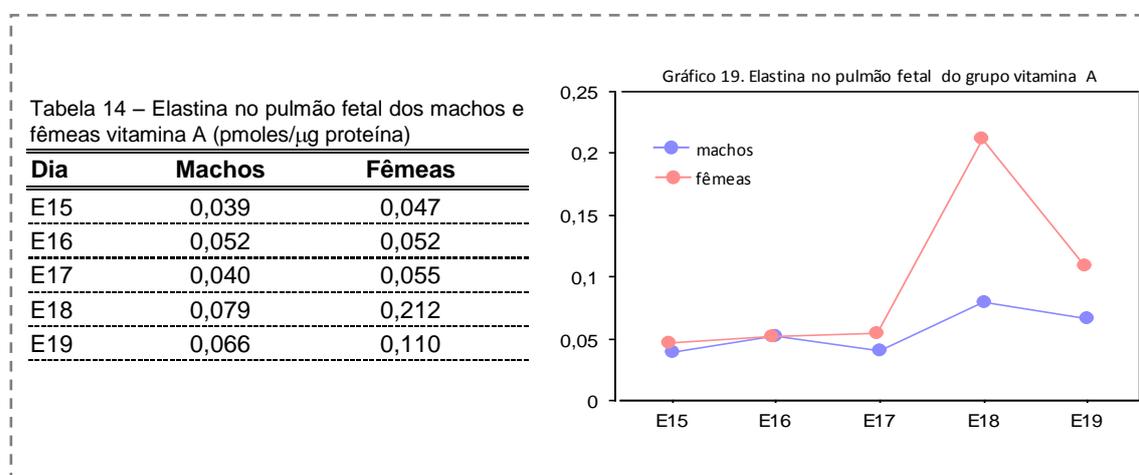


A análise estatística comparativa mostrou que nos dias E18 e E19 as fêmeas controlo apresentaram mais elastina que os machos controlo, mas no dia E16 os machos apresentaram um valor ligeiramente superior aos das fêmeas. No dia E15 não houve diferença entre géneros e no dia E17 os valores foram muito semelhantes. No entanto, estas diferenças apenas foram estatisticamente significativas nos dias E18 e E19 (quadro 15).

Quadro 15. Análise estatística comparativa do teor de elastina entre machos (Mc) e fêmeas controlo (Fc).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value			
<b>Mc vs Fc</b>	0 / ----	0,012/ 0,0029	-0,002/ 0,3081	<b>-0,133/ &lt;0,0001</b>	<b>-0,051/ &lt;0,0001</b>

O conteúdo de elastina nos pulmões fetais das **fêmeas com vitamina A** foi aumentando gradualmente ao longo da gestação, enquanto que nos **machos com vitamina** foi observada uma variação no teor de elastina durante os cinco dias de gestação (tab. 14/graf. 19). No dia E15 o teor de elastina nas fêmeas foi de 0,047 pmoles, no dia E16 de 0,052 pmoles, observando-se uma ligeira subida no dia E17, para 0,055 pmoles. No dia E18 ocorreu um aumento acentuado de elastina, para 0,212 pmoles, descendo acentuadamente no dia E19 para 0,110 pmoles (tab. 14/graf. 19). Nos machos o teor de elastina foi de 0,039 pmoles no dia E15, de 0,052 pmoles no dia E16 e de 0,040 pmoles no dia E17. Houve um aumento para 0,079 pmoles no dia E18 e depois uma descida para 0,066 pmoles no dia E19 (tab. 14/graf. 19).



A análise estatística comparativa mostrou que nos dias E15, E17, E18 e E19 as fêmeas com vitamina apresentaram mais elastina do que os machos com vitamina e que no dia E16 o valor de elastina foi igual em ambos os géneros. Estas diferenças observadas apenas foram estatisticamente significativas no dia E18 (quadro 16).

Quadro 16. Análise estatística comparativa do teor de elastina entre machos (Ma) e fêmeas (Fa) com vitamina A.

Grupo vs grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value			
<b>Ma vs Fa</b>	-0,008/ 0,0051	0 / ----	-0,015/ 0,0035	<b>-0,133/ &lt;0,0001</b>	-0,044/ 0,0002

O estudo comparativo do teor de elastina **pulmonar entre as fêmeas controlo e fêmeas com vitamina A**, permitiu verificar que o teor de elastina foi semelhante entre os dois grupos, embora sempre superior nas fêmeas com

vitamina A, e que as oscilações do teor de elastina ao longo da gestação também foram idênticas em ambos os grupos (graf. 20).

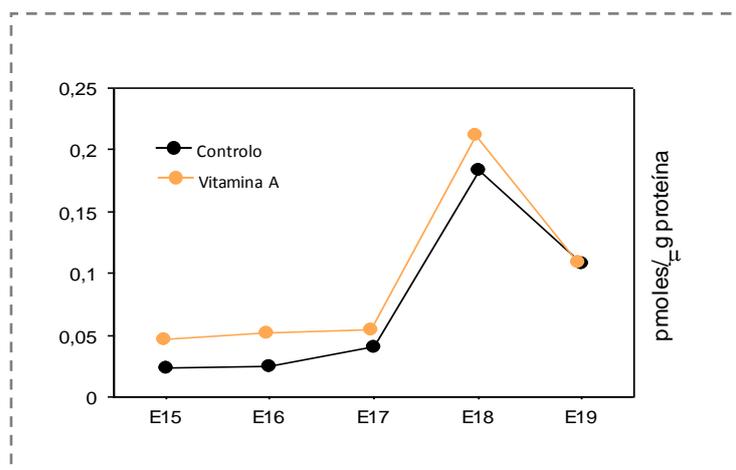


Gráfico 20. Valor médio de elastina no pulmão fetal nas fêmeas controlo e fêmeas vitamina A (média±SE).

A análise estatística comparativa entre os dois grupos não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa (quadro 17).

Quadro 17. Análise estatística comparativa do teor de elastina entre fêmeas controlo (Fc) e vitamina A (Fa).

Grupo vs grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value				
<b>Fc vs Fa</b>	-0,024/ 0,0016	-0,027/ 0,0002	-0,015 / 0,0041	-0,029/ 0,0003	-0,002/ 0,4900

O estudo comparativo do teor de **elastina pulmonar entre os machos controlo e machos com vitamina A**, permitiu verificar que o teor de elastina foi superior nos machos com vitamina, com excepção do dia E17 em que o teor de elastina foi semelhante à dos machos controlo (graf. 21).

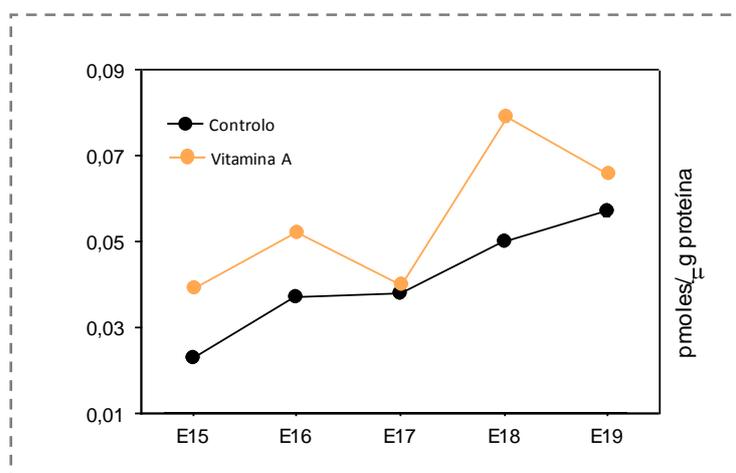


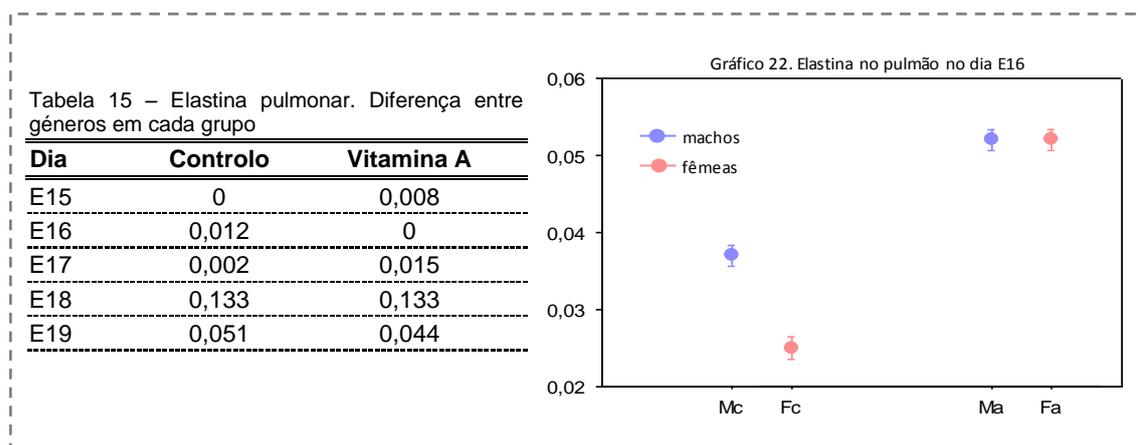
Gráfico 21. Valor médio de elastina no pulmão fetal nos machos controlo e machos vitamina A (média±SE).

A análise estatística comparativa entre os dois grupos não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa (quadro 18).

Quadro 18. Análise estatística comparativa do teor de elastina entre machos controlo (Mc) e vitamina A (Ma).

Grupo vs grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value				
<b>Mc vs Ma</b>	-0,016/ 0,0010	-0,015/ 0,0018	-0,002 / 0,2010	-0,029/ 0,0004	-0,009/ 0,0216

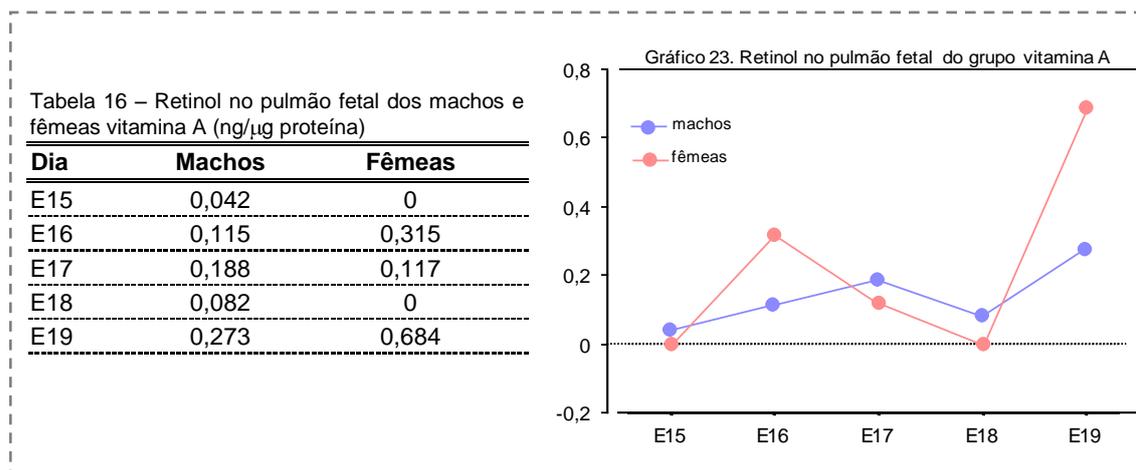
Quando relacionamos a **diferença do teor de elastina entre géneros do grupo controlo com a diferença entre géneros do grupo com vitamina A**, podemos verificar que, nos dias de gestação E16 (graf. 22) e E19 ocorreu uma redução na diferença entre géneros no grupo com vitamina A (tab. 15). Nos dias E15 e E17 a diferença foi maior no grupo com vitamina, e no dia E18 a diferença entre géneros foi igual nos dois grupos (tab. 15).



### 3.4. Quantificação do retinol no pulmão fetal

Durante os cinco dias de gestação estudados (E15-E19), não foi detectado retinol nos pulmões fetais em **ambos os géneros do grupo controlo**.

Pelo contrário, nas fêmeas e machos do **grupo com vitamina A** conseguimos detectar retinol pulmonar, observando-se variações ao longo do tempo de gestação estudado (tab. 16). Nas fêmeas com vitamina, apenas foi detectado e quantificado retinol pulmonar ao dia E16, E17 e E19, cujos valores foram de 0,315ng, 0,117ng e 0,684ng respectivamente. Nos machos com vitamina foi possível quantificar retinol em todos os dias de gestação, observando-se nos primeiros três, um aumento progressivo desses valores, isto é, no dia E15 foi detectado 0,042ng, no dia E16 0,115ng e no dia E17 0,188ng de retinol. No dia E18 os valores baixam para 0,082ng, voltando a subir no dia de gestação E19 para 0,273ng (tab. 16/graf. 23).



No estudo comparativo entre machos e fêmeas com vitamina A, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas nos dias de gestação E15, E16, E17 e E19 (quadro 19).

Quadro 19. Análise estatística do retinol no pulmão fetal das fêmeas (Fa) e machos vitamina A (Ma).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Ma vs Fa</b>	<b>0,042 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,20 / &lt;0,0001</b>	<b>0,071 / &lt;0,0001</b>	0,082 / 0,0002	<b>-0,411 / &lt;0,0001</b>

O **estudo comparativo** do teor de retinol no pulmão fetal entre **fêmeas controlo e fêmeas com vitamina A**, mostrou diferenças estatisticamente significativas nos dias de gestação E16, E17 e E19, precisamente nos únicos dias

em que as fêmeas com vitamina apresentaram valores de retinol quantificáveis (graf. 24).

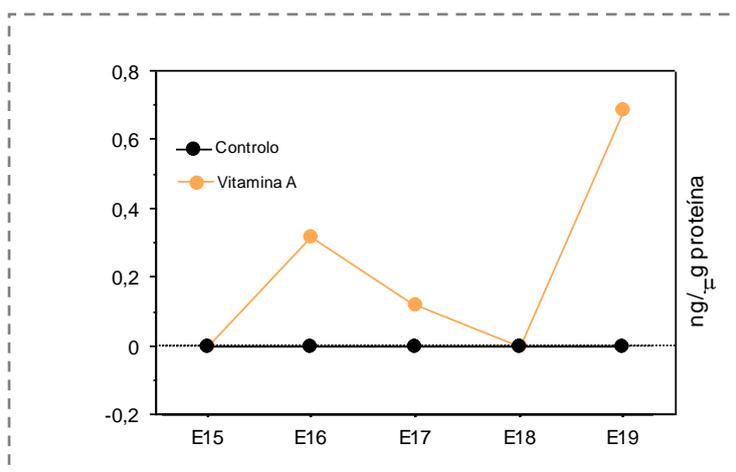


Gráfico 24. Valor médio de retinol no pulmão fetal das fêmeas controle e fêmeas vitamina A (média±SE).

O estudo comparativo do teor de retinol no pulmão fetal entre machos controle e machos com vitamina A, demonstrou diferenças estatisticamente significativas em todos dias de gestação, uma vez que nos machos controle nunca foi detectado retinol, e machos com vitamina foi encontrado nos cinco dias do estudo (graf. 25).

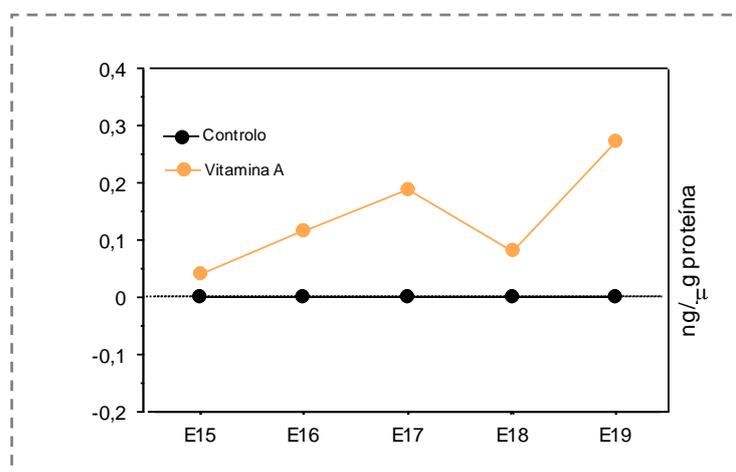
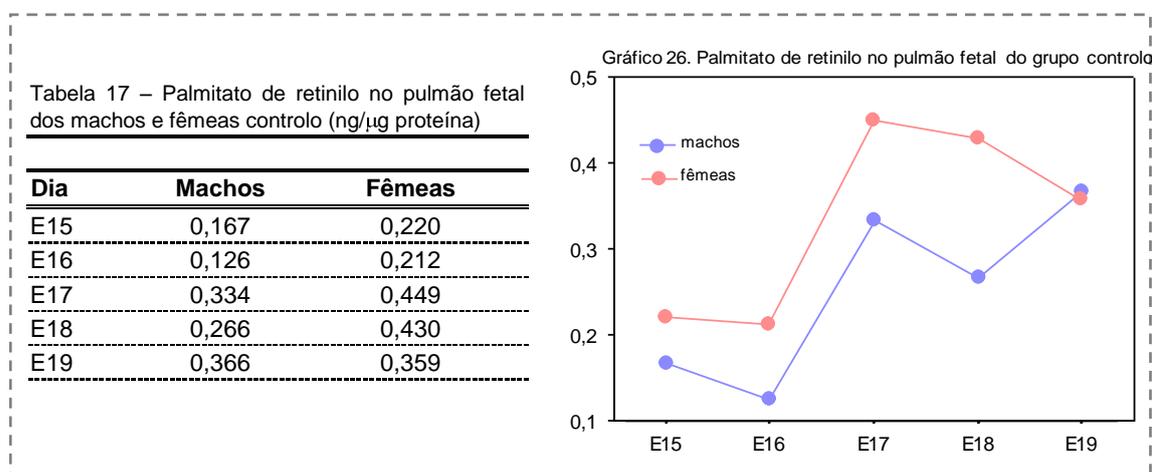


Gráfico 25. Valor médio de retinol no pulmão fetal dos machos controle e machos vitamina A (média±SE).

### 3.5. Quantificação do palmitato de retinilo no pulmão fetal

Durante os cinco dias de gestação estudados (E15-E19), foi quantificado palmitato de retinilo nos pulmões fetais de ambos os géneros do **grupo controlo** (tab. 17/graf. 26). Nas fêmeas, os valores de palmitato foram de 0,220ng no dia E15, 0,212ng no dia E16, aumentando para 0,449 ng no dia E17. Nos dias seguintes o valor baixou para 0,430ng no dia E18 e 0,359ng no E19. Nos primeiros três dias de gestação os valores de palmitato nos machos foram sempre inferiores, sendo de 0,167ng no dia E15, 0,126ng no dia E16 e 0,334ng no dia E17. No dia E18 o palmitato baixou para 0,266ng e no dia E19 aumentou para 0,366ng (tab. 17/graf. 26).



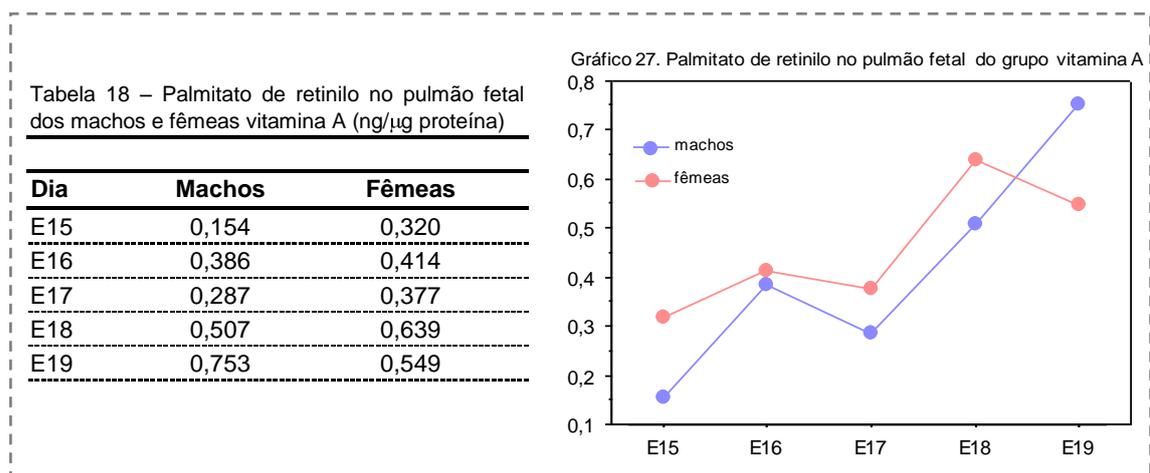
No **estudo comparativo entre machos e fêmeas controlo** observámos que os machos apresentaram menos palmitato de retinilo que as fêmeas e que estas diferenças foram estatisticamente significativas nos dias de gestação E15, E16, E17 e E18 (quadro 20).

Quadro 20. Análise estatística do palmitato de retinilo no pulmão fetal das fêmeas (Fc) e machos controlo (Mc).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Mc vs Fc</b>	<b>-0,053/ &lt;0,0001</b>	<b>-0,086 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,115 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,164 / &lt;0,0001</b>	0,007 / 0,0004

No **grupo com vitamina A** foi quantificado palmitato de retinilo nos pulmões fetais de ambos os géneros entre os dias de gestação E15 e E19 (tab. 18/graf.

27). Nas fêmeas os valores de palmitato foram de 0,320ng no dia E15, 0,414ng no dia E16, descendo para 0,377ng no dia E17. No dia seguinte o valor subiu para 0,639ng (E18) e no dia E19 desceu para 0,549ng. Nos machos os valores de palmitato foram de 0,154ng no dia E15, 0,386ng no dia E16 e 0,287ng no dia E17. Nos dias seguintes, E18 e E19, os valores aumentaram para 0,507ng e 0,753ng respectivamente (tab. 18/graf. 27).



No **estudo comparativo entre machos e fêmeas com vitamina A** foi observado que os machos apresentaram menos palmitato de retinilo que as fêmeas, com exceção do dia E19. Estas diferenças foram estatisticamente significativas em todos os dias de gestação estudados (quadro 21).

Quadro 21. Análise estatística do palmitato de retinilo no pulmão fetal das fêmeas (Fa) e machos com vitamina A (Ma).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value			
<b>Ma vs Fa</b>	<b>-0,166/ &lt;0,0001</b>	<b>-0,028/ &lt;0,0001</b>	<b>-0,09 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,132 / &lt;0,0001</b>	<b>0,204 / &lt;0,0001</b>

O **estudo comparativo** do teor de palmitato de retinilo no pulmão fetal **entre fêmeas controlo e fêmeas com vitamina A**, mostrou que, à exceção do dia E17, os valores de palmitato nas fêmeas controlo foram sempre inferiores aos das fêmeas com vitamina A (graf. 28).

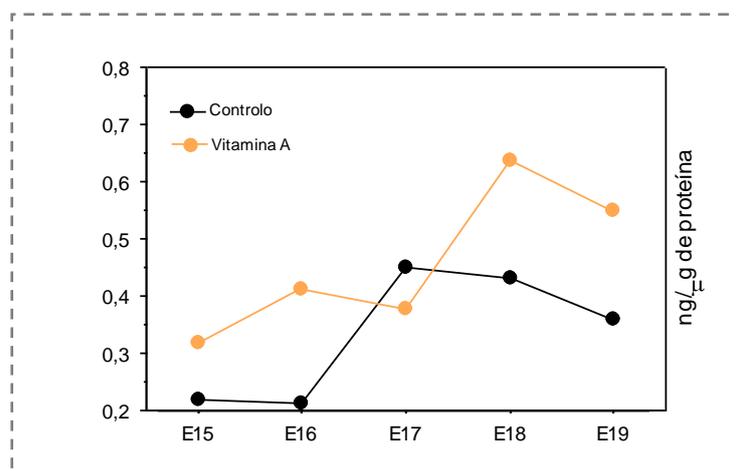


Gráfico 28. Valor médio de palmitato de retinilo no pulmão fetal das fêmeas controle e fêmeas vitamina A (média±SE).

As diferenças observadas entre os dois grupos foram estatisticamente significativas nos dias de gestação E15, E16, E18 e E19 (quadro 22).

Quadro 22. Análise estatística do palmitato de retinilo no pulmão fetal das fêmeas controle (Fc) e vitamina A (Fa).

Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value				
Fc vs Fa	-0,100/ <0,0001	-0,202 / <0,0001	0,072/ >0,999	-0,209/ <0,0001	-0,190 / <0,0001

O estudo comparativo do teor de palmitato de retinilo no pulmão fetal entre machos controle e machos com vitamina A, mostrou que nos dias E16, E18 e E19 os valores de palmitato nos machos controle foram inferiores aos dos machos com vitamina. No dia E15 os valores obtidos foram semelhantes, mas no dia E17 os machos controle apresentaram mais palmitato que os machos com vitamina (graf. 29).

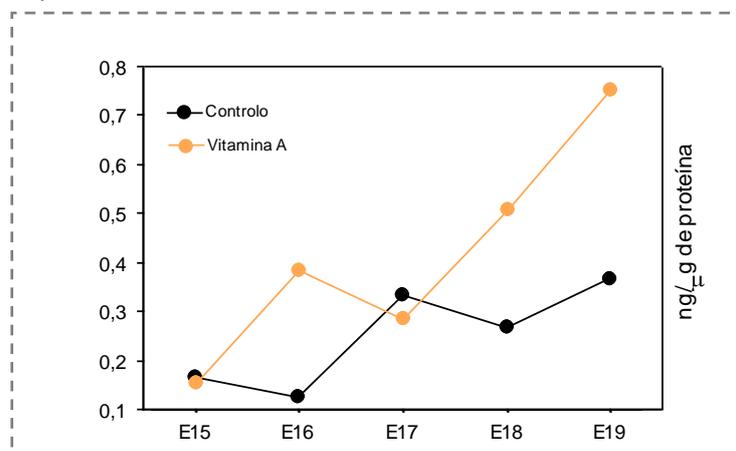


Gráfico 29. Valor médio de palmitato de retinilo no pulmão fetal dos machos controle e machos vitamina A (média±SE).

As diferenças observadas entre os dois grupos foram estatisticamente significativas nos dias de gestação E16, E17, E18 e E19 (quadro 23).

Quadro 23. Análise estatística do palmitato de retinilo no pulmão fetal dos machos controlo (Mc) e vitamina A (Ma).

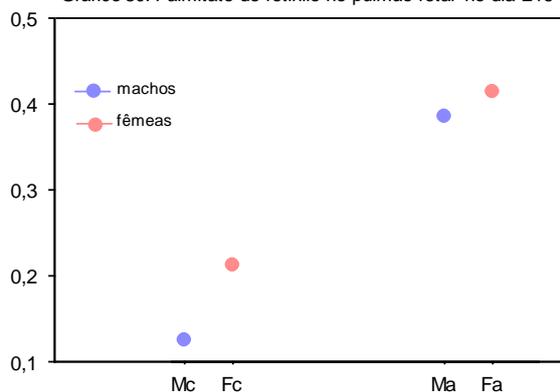
Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Mc vs Ma</b>	0,013/ 0,0167	<b>-0,26 / &lt;0,0001</b>	<b>0,047/ &lt;0,0001</b>	<b>-0,241 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,387 / &lt;0,0001</b>

Quando comparámos as diferenças entre géneros do grupo controlo com as diferenças do grupo com vitamina A, no que diz respeito ao teor de palmitato de retinilo no pulmão fetal, conseguimos observar que nos dias de gestação E16, E17 e E18 a diferença entre géneros no grupo com vitamina A foi menor quando comparado com o grupo controlo (tab. 19/ graf. 30). Nos dias E15 e E19, a diferença entre géneros foi menor no grupo controlo.

Tabela 19 – Palmitato de retinilo no pulmão. Diferença entre géneros em cada grupo (ng/μg proteína)

Dia	Controlo	Vitamina A
E15	0,053	0,166
E16	0,086	0,028
E17	0,115	0,09
E18	0,164	0,132
E19	0,007	0,204

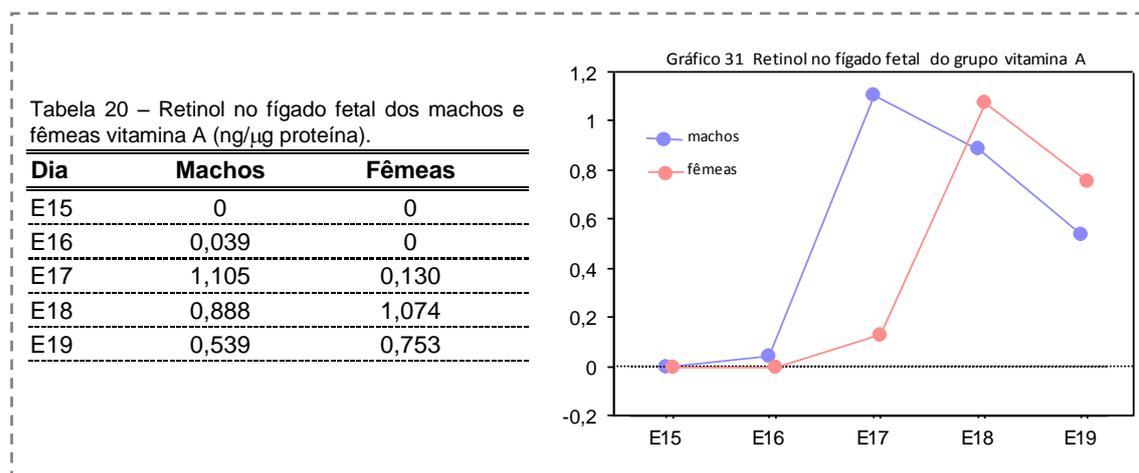
Gráfico 30. Palmitato de retinilo no pulmão fetal no dia E16



### 3.6. Quantificação do retinol no fígado fetal

Durante os cinco dias de gestação estudados (E15-E19), não foi detectado retinol nos fígados fetais das fêmeas e machos **do grupo controlo**.

Pelo contrário, em ambos os géneros do **grupo com vitamina A** conseguimos detectar retinol no fígado, observando-se variações ao longo do tempo de gestação estudado (tab. 20/graf. 31). Nas fêmeas com vitamina, apenas foi detectado retinol no fígado a partir do dia E17, com um valor de 0,130ng. No dia E18 o retinol atingiu o valor máximo de 1,074ng, para no dia E19 descer para 0,753ng. Nos machos com vitamina foi possível quantificar retinol um dia mais cedo, no dia E16, com o valor de 0,039ng. No dia E17 atingiu o valor mais elevado de retinol observado no fígado dos machos, com 1,105ng, descendo no dia E18 para 0,888ng e no dia E19 para 0,539ng (tab. 20/graf. 31).



No estudo comparativo **entre machos e fêmeas** com vitamina A, foi possível observar que nos dias E16 e E17 o teor de retinol foi mais elevado nos machos, mas que nos dias E18 e E19 passou a ser mais baixo do que nas fêmeas. Estas diferenças foram estatisticamente significativas nos dias de gestação referidos anteriormente (E16, E17, E18 e E19) (quadro 24).

Quadro 24. Análise estatística do retinol no fígado fetal das fêmeas (Fa) e machos vitamina A (Ma).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Ma vs Fa</b>	---	<b>0,039 / &lt;0,0001</b>	<b>0,975/ &lt;0,0001</b>	<b>-0,186 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,214 / &lt;0,0001</b>

O **estudo comparativo** do teor de retinol entre **fêmeas controlo e fêmeas com vitamina A**, mostrou diferenças estatisticamente significativas nos dias de

gestação E17, E18 e E19, o que correspondeu aos dias em que as fêmeas com vitamina apresentaram retinol no fígado (graf. 32).

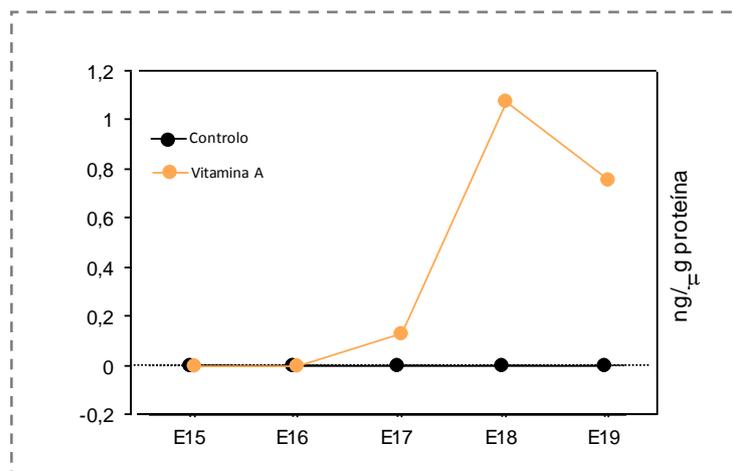


Gráfico 32. Valor médio de retinol no fígado fetal das fêmeas controlo e fêmeas vitamina A (média±SE).

O **estudo comparativo** do teor de retinol entre **machos controlo e machos com vitamina A**, demonstrou diferenças estatisticamente significativas nos dias de gestação E17, E18 e E19, precisamente nos dias em que foi quantificado retinol nos fígados dos machos com vitamina (graf. 33).

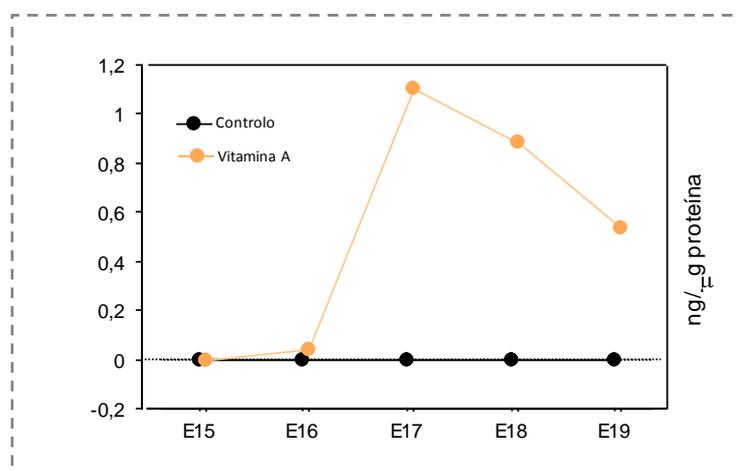
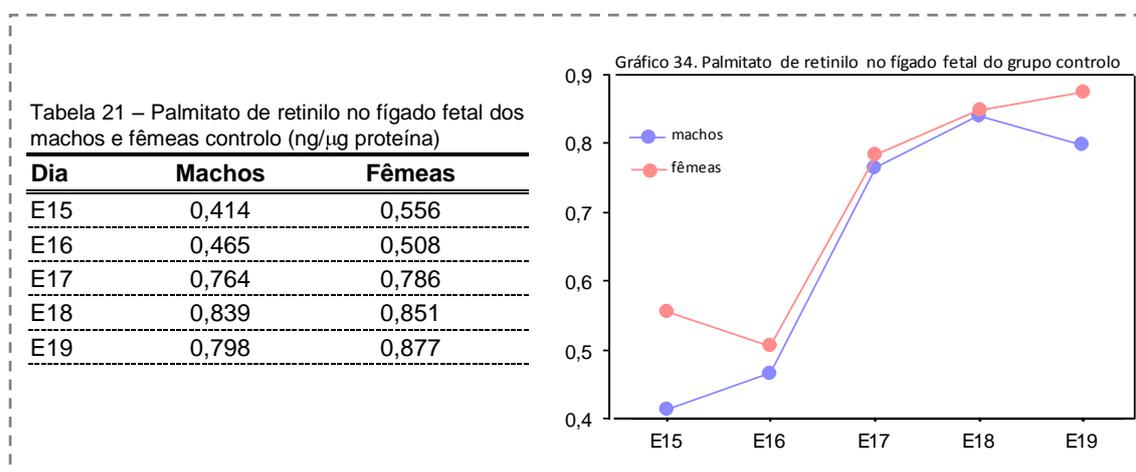


Gráfico 33. Valor médio de retinol no fígado fetal dos machos controlo e machos vitamina A (média±SE).

### 3.7. Quantificação do palmitato de retinilo no fígado fetal

Durante os dias de gestação E15 a E19, foi quantificado palmitato de retinilo nos fígados fetais de ambos os géneros do **grupo controlo** (tab. 21/graf. 34). As fêmeas controlo apresentaram 0,556ng de palmitato de retinilo no dia E15 e 0,508ng no dia E16. Nos dias seguintes os valores iniciaram um aumento progressivo com 0,786ng no dia E17, 0,851ng no dia E18 e 0,877ng no dia E19 (tab. 21/graf. 34). Nos machos o palmitato foi aumentando desde o dia de gestação E15 até ao dia E18, sendo os valores de 0,414ng no dia E15, 0,465ng no dia E16, 0,764ng no dia E17 e 0,839ng no dia E18. No dia E19 ocorreu uma ligeira diminuição no teor de palmitato de retinilo, para 0,798ng (tab. 21/graf. 34).

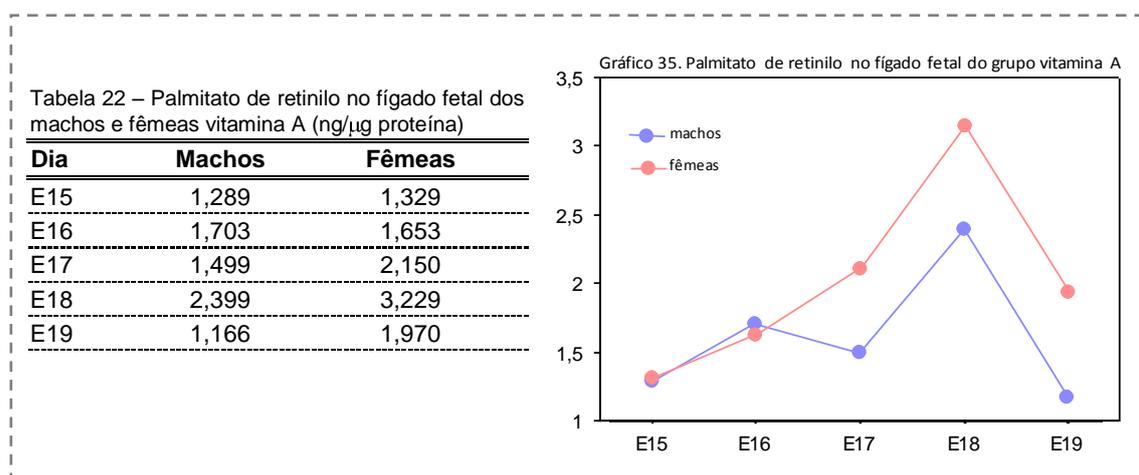


No **estudo comparativo entre machos e fêmeas controlo** observámos que os valores de palmitato de retinilo foram menores nos machos controlo em todos os dias de gestação, mas que essas diferenças apenas foram estatisticamente significativas nos dias E15, E16 e E19 (quadro 25). Nos restantes dias (E17 e E18) os valores observados foram muito semelhantes, não havendo diferenças estatisticamente significativas (quadro 25).

Quadro 25. Análise estatística do palmitato de retinilo no fígado fetal das fêmeas (Fc) e machos controlo (Mc).

Grupo Vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Mc vs Fc</b>	<b>-0,142/ &lt;0,0001</b>	<b>-0,043 / &lt;0,0001</b>	-0,022 / 0,0020	-0,012 / 0,0023	<b>-0,079 / &lt;0,0001</b>

Nos machos e fêmeas do **grupo com vitamina A** o palmitato de retinilo esteve presente durante os cinco dias estudados, apresentando valores muito superiores aos do grupo controlo (tab. 22/ graf. 35). Nas fêmeas foi observado um aumento progressivo do teor de palmitato desde o dia de gestação E15 até ao dia E18. Assim, no dia E15 quantificámos 1,329ng de palmitato, dia E16 1,653ng e no dia E17 2,15ng. Dia E18 foi determinado o valor mais elevado de palmitato, 3,229 ng, o qual baixou no dia E19 para 1,970ng (tab. 22/ graf. 35). Nos machos foram observadas maiores oscilações no teor de palmitato de retinilo, começando por apresentar um valor de 1,289ng no dia E15, que subiu para 1,703ng no dia E16. No dia E17, o valor desceu para 1,499ng, voltando a subir para 2,399ng no dia E18, o maior valor detectado nos machos, e descendo para 1,166ng no dia E19 (tab. 22/ graf. 35).



No **estudo comparativo entre machos e fêmeas com vitamina A**, observámos que os valores de palmitato de retinilo nos machos foram menores que as fêmeas nos dias de gestação E15, E17, E18 e E19, apenas sendo maior no dia E16. No entanto estas diferenças apenas foram estatisticamente significativas nos dias de gestação E16, E17, E18 e E19 (quadro 26).

Quadro 26. Análise estatística do palmitato de retinilo no fígado fetal das fêmeas (Fa) e machos vitamina A (Ma).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Ma vs Fa</b>	-0,040 / 0,0003	<b>0,050 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,651 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,830 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,804 / &lt;0,0001</b>

O **estudo comparativo** do teor de palmitato de retinilo no fígado fetal entre **fêmeas controle e fêmeas com vitamina A**, mostrou que as fêmeas com vitamina A apresentaram sempre mais palmitato de retinilo no fígado que as fêmeas controle (graf. 36).

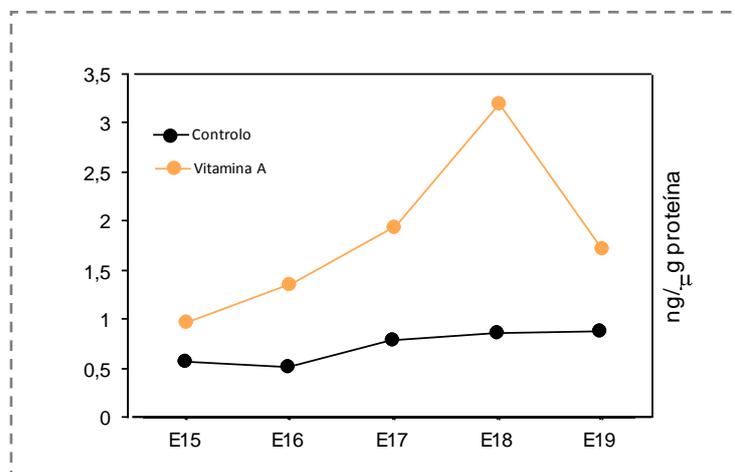


Gráfico 36. Valor médio de palmitato de retinilo no fígado fetal das fêmeas controle e fêmeas vitamina A (média±SE).

Estas diferenças foram estatisticamente significativas em todos os dias de gestação estudados (E15 a E19) (quadro 27).

Quadro 27. Análise estatística do palmitato de retinilo no fígado fetal das fêmeas controle (Fc) e vitamina A (Fa).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value				
<b>Fc vs Fa</b>	<b>-0,773 / &lt;0,0001</b>	<b>-1,145 / &lt;0,0001</b>	<b>-1,364 / &lt;0,0001</b>	<b>-2,378 / &lt;0,0001</b>	<b>-1,093 / &lt;0,0001</b>

No **estudo comparativo** do teor de palmitato de retinilo no fígado fetal entre **machos controle e machos com vitamina A**, foi possível observar que os machos com vitamina A apresentaram sempre mais palmitato de retinilo que os machos controle (graf. 37).

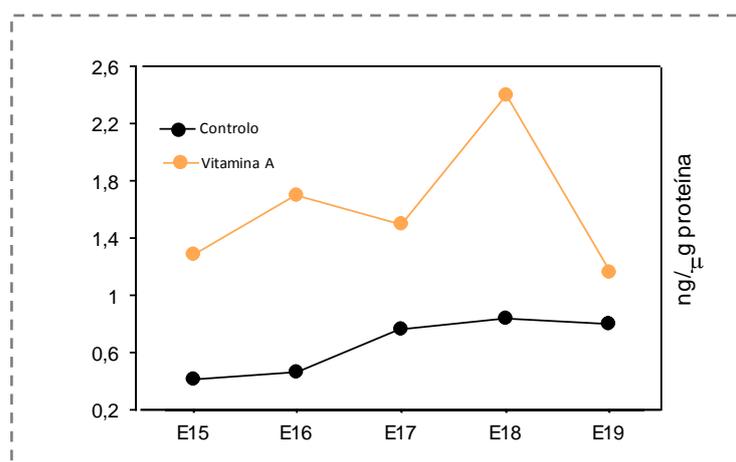


Gráfico 37. Valor médio de palmitato de retinilo no fígado fetal dos machos controlo e machos vitamina A (média±SE).

Estas diferenças foram estatisticamente significativas em todos os dias de gestação estudados (E15 a E19) (quadro 28).

Quadro 28. Análise estatística do palmitato de retinilo no fígado fetal dos machos controlo (Mc) e vitamina A (Ma).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value				
<b>Mc vs Ma</b>	<b>-0,875 / &lt;0,0001</b>	<b>-1,238 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,735 / &lt;0,0001</b>	<b>-1,560 / &lt;0,0001</b>	<b>-0,368 / &lt;0,0001</b>

No que diz respeito ao teor de palmitato de retinilo no fígado fetal, a comparação entre as diferenças de géneros do grupo controlo com as diferenças do grupo com vitamina A, permitiu observar que apenas no dia de gestação E15 a diferença entre géneros foi menor no grupo com vitamina (graf. 38).

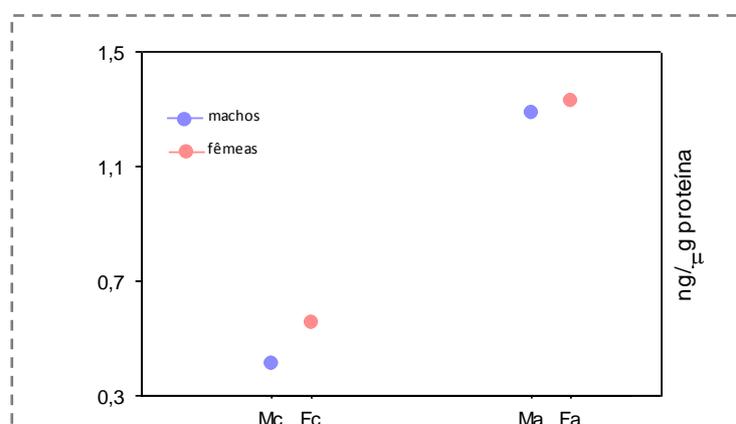


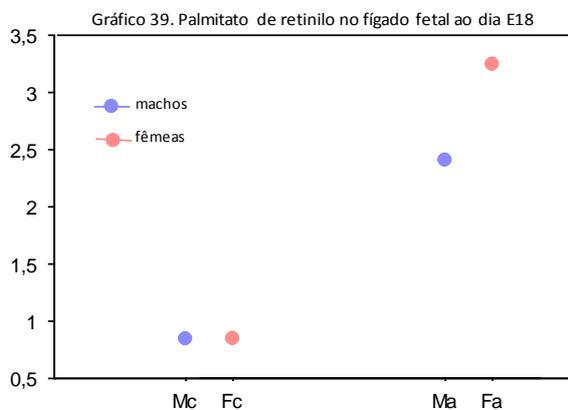
Gráfico 38. Diferença entre géneros no teor de palmitato de retinilo no fígado fetal ao dia E15. Legenda: Mc- macho controlo; Fc- fêmea controlo; Ma- macho vitamina; Fa- fêmea vitamina

Nos restantes dias de gestação, de E16 a E19, a diferença entre géneros foi sempre maior no grupo com vitamina A (tab. 23/graf. 39).

Tabela 23 – Palmitato de retinilo no fígado. Diferença entre géneros em cada grupo (ng/μg proteína)

Dia	Controlo	Vitamina A
E15	0,142	0,040
E16	0,043	0,050
E17	0,022	0,651
E18	0,012	0,830
E19	0,079	0,804

Legenda: Mc- macho controlo; Fc- fêmea controlo;  
Ma- macho vitamina; Fa- fêmea vitamina



### 3.8. Estudo imunocitoquímico dos receptores de estrogénios (ER $\alpha$ e ER $\beta$ )

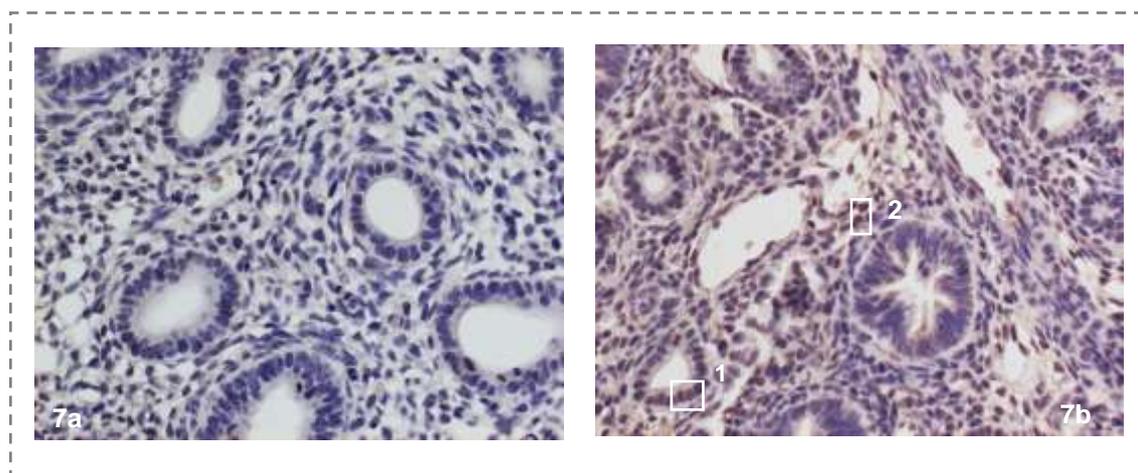
Nos cinco dias de gestação estudados não detectámos imunomarcação para o receptor ER $\alpha$  no pulmão fetal dos **machos e fêmeas do grupo controlo**. Pelo contrário, localizámos imunomarcação para o receptor ER $\beta$  em ambos os géneros, sendo possível observar diferenças na sua expressão ao longo da gestação (tab. 24).

Tabela 24. Receptor ER $\beta$  nas fêmeas e machos controlo entre os dias E15-E19

Dia de gestação	Intensidade		Localização	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
E15	---	+	---	M/E
E16	+	++	M/E	E
E17	+	++	M/E	E
E18	++	+++	E	E
E19	++	++	E	E

(Legenda: -- sem marcação; + intensidade fraca; +++ intensidade forte; M- células mesenquimatosas; E- células epiteliais).

Nos **machos** do grupo controlo, o receptor ER $\beta$  não foi detectado no dia de gestação E15, mas no dia E16 já foi visível uma imunomarcação de intensidade fraca (castanho claro), localizada nas células mesenquimatosas e nas epiteliais de revestimento das futuras áreas condutoras, marcando 27,65% das células epiteliais (fotog. 7a e 7b).



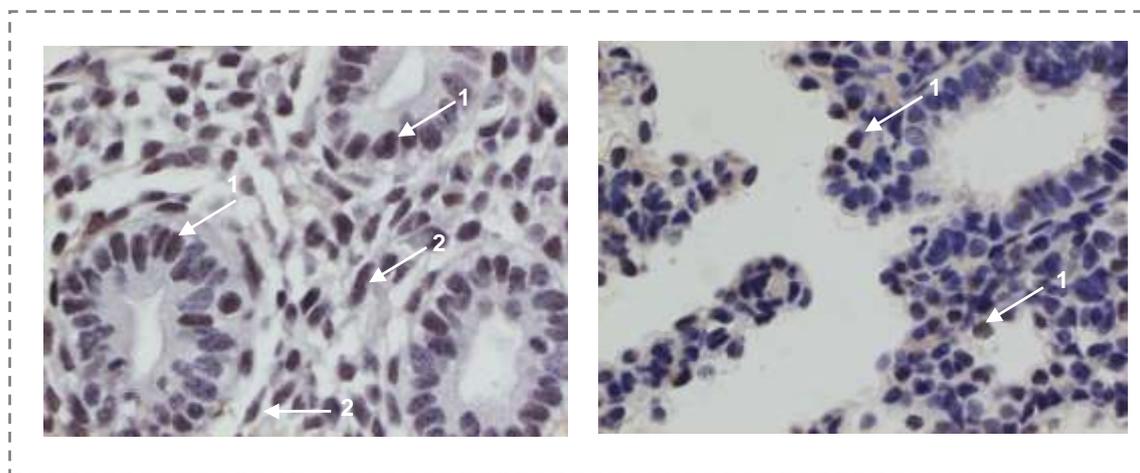
Fotografia 7 - Pulmão fetal nos machos controlo no dia de gestação E15 (7a) e dia E16 (7b) (200x; ICQ).

Legenda: 1. Célula epitelial positiva; 2. Célula mesenquimatosa positiva.

No dia E17 a intensidade da imunomarcação foi semelhante, mas apenas localizada nas células do epitélio de revestimento das futuras porções condutoras,

ocorrendo uma redução no número de células epiteliais marcadas, para um valor de 21,32%. No dia E18 a imunomarcacão apresentou-se mais intensa (castanho escuro), com a mesma localizacão celular, mas em maior número de células epiteliais (28,48%). A imunomarcacão no dia E19 reduziu de intensidade, manteve a localizacão celular e aumentou o número de células marcadas positivamente (34,27%).

Nas **fêmeas** do grupo controlo o receptor ER $\beta$  foi detectado no dia de gestacão E15, com uma imunomarcacão de intensidade fraca (castanho claro), distribuída pelas células mesenquimatosas e células epiteliais em diferenciaçã, marcando 27,01% das células epiteliais (fotog. 8a). Nos dias seguintes, E16 e E17, a imunomarcacão apresentou-se ligeiramente mais intensa, com localizacão confinada às células epiteliais de revestimento das futuras partes condutoras, marcando 27,77% das células epiteliais no dia E16 e 15,98% no dia E17. Observou-se um aumento notório na intensidade da marcaçã no dia E18 (tonalidade castanho escuro), com localizacão nas células epiteliais que revestem os bronquíolos terminais ou bronquíolos respiratórios em formaçã, observando-se um aumento no número de células epiteliais marcadas, cujo valor foi de 30,55% (fotog. 8b).

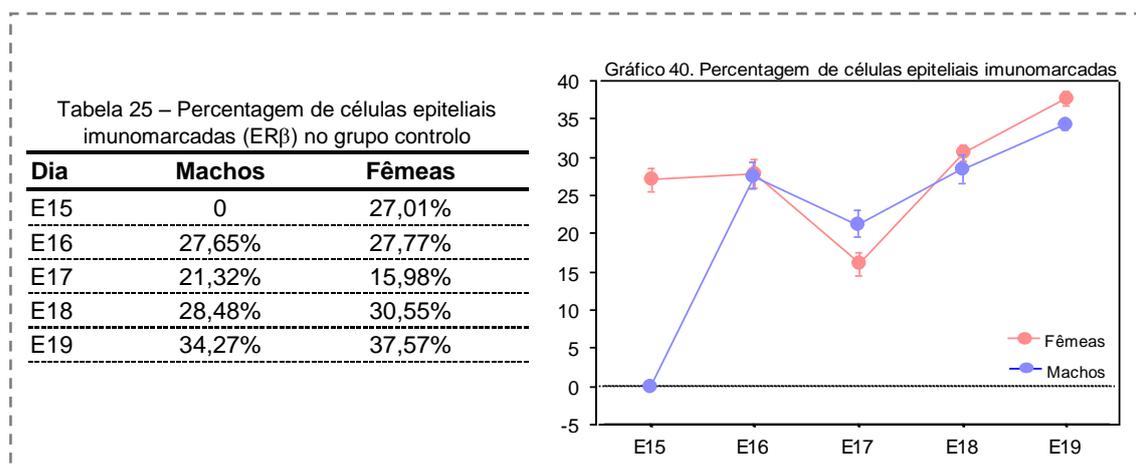


Fotografia 8 - Pulmão fetal nas fêmeas controlo no dia de gestacão E15 (8a) e dia E18 (8b) (400x; ICQ).  
Legenda: 1. Célula epitelial positiva; 2. Célula mesenquimatosa positiva.

No dia E19 manteve-se a mesma localizacão celular, houve uma diminuicão na intensidade da imunomarcacão e observou-se um aumento das células epiteliais marcadas positivamente para 37,57%.

A **comparaçã** da expressã do ER $\beta$  nos **machos e fêmeas controlo**, permite verificar que as fêmeas começã a expressar o receptor um dia mais cedo que os machos e que a intensidade da imunomarcacão se mostrou mais

intensa nas fêmeas durante todos os dias de gestação estudados. Também foi possível observar que a partir do dia E16, as fêmeas passam a expressar o ER $\beta$  apenas nas células epiteliais, enquanto os machos apenas o fazem a partir do dia E18 (tab. 25/graf. 40).



Quanto à percentagem de células epiteliais imunomarcadas, nos dias E16 e E17 os machos apresentam valores superiores aos das fêmeas. Nos dias E18 e E19 acontece precisamente o contrário, ou seja, as fêmeas apresentaram mais células epiteliais positivas que os machos. No entanto, em ambas as situações as diferenças não foram estatisticamente significativas (quadro 29).

Quadro 29. Análise estatística comparativa da percentagem de células epiteliais imunomarcadas entre machos (Mc) e fêmeas controlo (Fc).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value				
<b>Fc vs Mc</b>	27,01 / <0,0001	0,118 / 0,9682	-5,34 / 0,0682	2,063 / 0,4646	3,299 / 0,0117

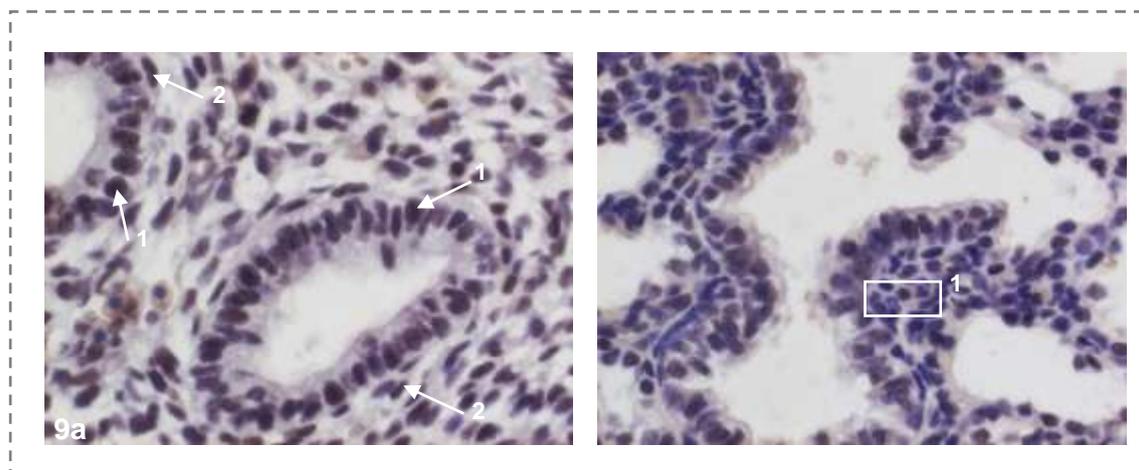
À semelhança do grupo controlo também não detectámos receptor ER $\alpha$  nos pulmões fetais dos **machos e fêmeas do grupo com vitamina A**, nos cinco dias de gestação analisados. Quanto ao receptor ER $\beta$ , ambos os géneros evidenciaram imunomarcção, que variou de intensidade e de localização celular ao longo da gestação (tab. 26).

Tabela 26. Receptor ER $\beta$  nas fêmeas e machos vitamina A entre os dias E15-E19

Dia de gestação	Intensidade		Localização	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<b>E15</b>	+	+	M/E	M/E
<b>E16</b>	+	+	M/E	M/E
<b>E17</b>	++	++	M/E	E
<b>E18</b>	++	++	E	E
<b>E19</b>	++	+++	E	E

(Legenda: -- sem marcação; + intensidade fraca; +++ intensidade forte; M- células mesenquimatosas; E- células epiteliais).

Nos **machos** o receptor ER $\beta$  foi observado no dia E15, localizando-se nas células mesenquimatosas e em 43,84% das células epiteliais de revestimento, com uma tonalidade castanho claro (fotog. 9a), o mesmo acontecendo no dia E16, onde apenas houve um ligeiro aumento do número de células epiteliais com marcação (44,61%). No dia E17 a imunomarcação ficou mais intensa, mantendo a localização, mas sofrendo um ligeiro aumento das células epiteliais imunomarcadas (44,89%).

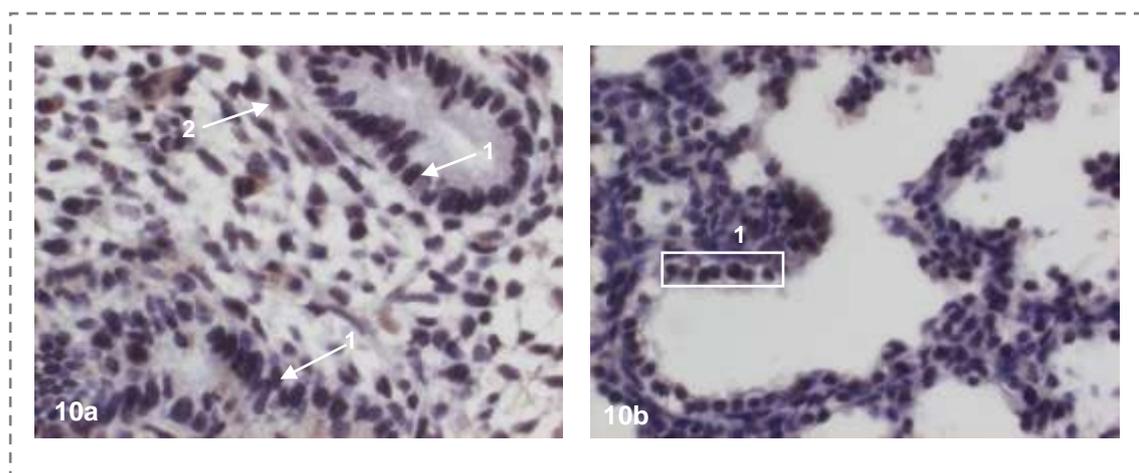


Fotografia 9 - Pulmão fetal nos machos vitamina A no dia de gestação E15 (9a) e dia E19 (9b) (400x; ICQ).  
Legenda: 1. Célula epitelial positiva; 2. Célula mesenquimatosa positiva.

No dia E18 e E19 apenas as células epiteliais se apresentavam marcadas, o que aconteceu em 46,12% das células no dia E18 e em 47,87% no dia E19, mantendo-se a intensidade (fotog. 9b).

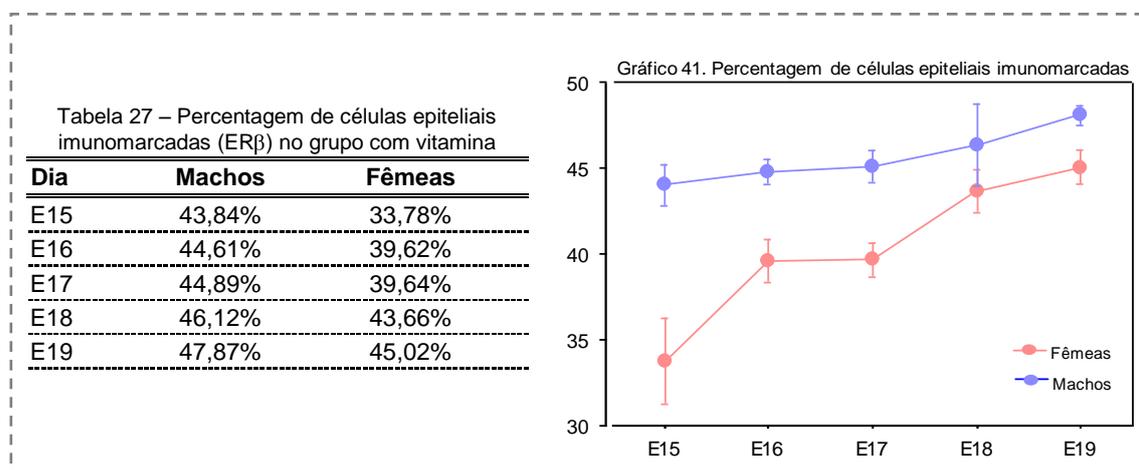
Nas **fêmeas** o receptor ER $\beta$  foi detectado no dia E15, com tonalidade castanho claro, e localização nas células mesenquimatosas e em 33,78% das células epiteliais de revestimento (fotog. 10a). No dia E16 a intensidade e localização celular manteve-se, apenas se identificando mais células epiteliais marcadas (39,62%). Houve um aumento da intensidade no dia E17 e uma

alteração na localização celular, que se restringiu às células epiteliais de revestimento das porções condutoras e futuras áreas alveolares (39,64%), permanecendo assim no dia E18, onde apenas observamos um acréscimo de células imunomarcadas (43,66%). No dia E19 a intensidade ficou mais forte (castanho-escuro), observando-se um ligeiro aumento do número de células epiteliais imunomarcadas para 45,02% (fotog. 10b).



Fotografia 10 - Pulmão fetal nas fêmeas vitamina A no dia de gestação E15 (10a) e dia E19 (10b) (400x; ICQ). Legenda: 1. Célula epitelial positiva; 2. Célula mesenquimatosa positiva.

**A comparação de expressão do receptor ER $\beta$  entre machos e fêmeas com vitamina**, permitiu-nos verificar que a intensidade da imunomarcação foi muito semelhante durante os cinco dias estudados. Ainda observamos que no dia E17, os machos apresentavam marcação nas células mesenquimatosas e epiteliais, enquanto nas fêmeas, apenas as células epiteliais se encontravam imunomarcadas (tab. 27/graf. 41).



Em qualquer dia de gestação, os machos apresentavam uma percentagem de células epiteliais imunomarcadas superior á das fêmeas, no entanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas (quadro 30).

Quadro 30. Análise estatística comparativa da percentagem de células epiteliais imunomarcadas entre machos (Ma) e fêmeas vitamina A (Fa).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value				
<b>Fa vs Ma</b>	-10,062 / 0,0255	-4,995 / 0,0015	-5,25 / 0,0170	-2,461 / 0,0912	-2,854 / 0,0332

**O estudo comparativo da expressão do receptor ER $\beta$  entre as fêmeas controlo e fêmeas com vitamina A** permitiu-nos observar que no dia E16 o grupo com vitamina, apresentou imunomarcção nas células epiteliais e células mesenquimatosas, enquanto no grupo controlo apenas foi visível marcação nas células epiteliais. A intensidade foi aumentando ao longo da gestação no grupo com vitamina, mas no grupo controlo ocorreram ligeiras oscilações (tab. 28).

Tabela 28. Imunomarcção ER $\beta$  nas fêmeas controlo e fêmeas vitamina A.

	E15	E16	E17	E18	E19
	Local./ intensid.				
<b>Controlo</b>	M/E / +	E / ++	E / ++	E / +++	E / ++
<b>Vitamina A</b>	M/E / +	M/E / +	E / ++	E / ++	E / +++

(Legenda: -- sem marcação; + intensidade fraca; +++ intensidade forte; M- células mesenquimatosas; E- células epiteliais).

No que diz respeito à percentagem de células epiteliais imunomarcadas, podemos verificar que durante toda a gestação, as fêmeas controlo apresentam valores inferiores aos das fêmeas com vitamina A (graf. 42). No dia de gestação E17 houve uma descida na percentagem de células imunomarcadas em ambos os grupos, que foi relativamente pequena nas fêmeas com vitamina, mais acentuada nas fêmeas controlo (graf. 42).

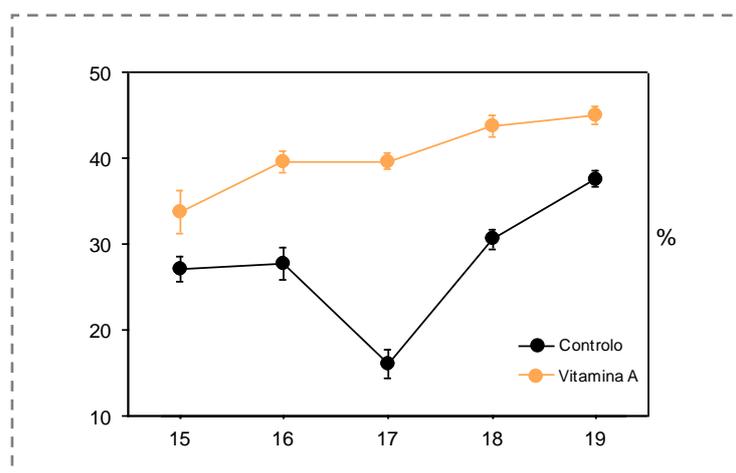


Gráfico 42. Valor médio da percentagem de células epiteliais ER $\beta$  positivas ao longo da gestação nas fêmeas do grupo controlo e fêmeas vitamina A.

A análise estatística comparativa entre grupos mostra diferenças estatisticamente significativas apenas no dia de gestação E17 (quadro 31).

Quadro 31. Análise estatística da percentagem de células epiteliais imunomarcadas nas fêmeas controlo (Fc) e fêmeas vitamina A (Fa).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Fc vs Fa</b>	-6,767 / 0,0053	-11,848 / 0,0001	<b>-23,665 / &lt;0,0001</b>	-13,111 / 0,0007	7,444 / 0,0014

**O estudo comparativo da expressão do receptor ER $\beta$  entre os machos controlo e machos com vitamina A**, permitiu-nos verificar que a localização da imunomarcção foi igual durante a gestação nos dois grupos, com excepção do dia E15, onde não foi observada marcação no grupo controlo. A intensidade também foi muito semelhante em ambos os grupos durante os cinco dias estudados (tab. 29).

Tabela 29. Imunomarcção ERB nos machos controlo e machos vitamina A

	E15	E16	E17	E18	E19
	Local./ intensid.				
<b>Controlo</b>	-----	M/E / +	M/E / +	E / ++	E / ++
<b>Vitamina A</b>	M/E / +	M/E / +	M/E / ++	E / ++	E / ++

(Legenda: -- sem marcação; + intensidade fraca; +++ intensidade forte; M- células mesenquimatosas; E- células epiteliais).

No que diz respeito à percentagem de células epiteliais imunomarcadas, os machos controlo apresentaram valores inferiores aos machos com vitamina durante toda a gestação (graf. 43). No grupo com vitamina A a percentagem de células epiteliais marcadas foi aumentando ao longo da gestação, mas nos machos controlo, foi observada uma diminuição acentuada no dia de gestação E17 (graf. 43).

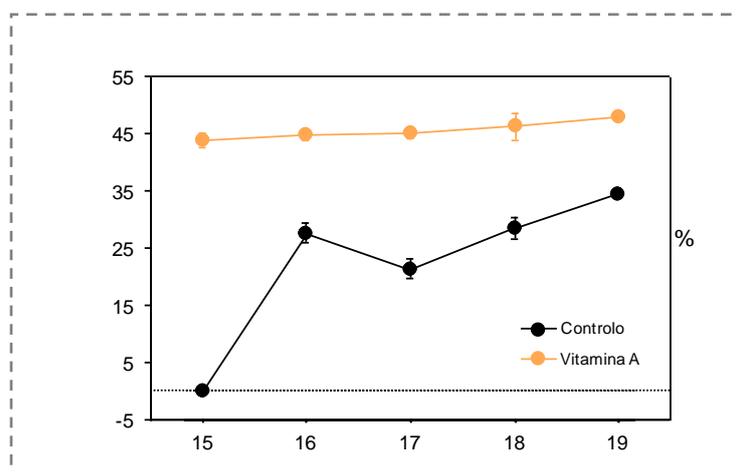


Gráfico 43. Valor médio da percentagem de células epiteliais ER $\beta$  positivas ao longo da gestação nos machos do grupo controlo e vitamina A.

A análise estatística comparativa entre grupos mostra diferenças estatisticamente significativas entre os machos controlo e machos com vitamina A durante todos os dias de gestação (quadro 32).

Quadro 32. Análise estatística da percentagem de células epiteliais imunomarcadas nos machos controlo (Mc) e machos vitamina A (Ma).

Grupo vs Grupo	Dia E15	Dia E16	Dia E17	Dia E18	Dia E19
	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value	Mean Dif./ p value
<b>Mc vs Ma</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>-16,961 / &lt;0,0001</b>	<b>-23,575 / &lt;0,0001</b>	<b>-17,635 / &lt;0,0001</b>	<b>-13,597 / &lt;0,0001</b>



*Discussão*

Foi no início do século XX, e com animais de experimentação, que foram detectados os primeiros efeitos da vitamina A no desenvolvimento dos sistemas respiratório e urogenital, tubo digestivo e olhos (Wolbach, 1925; Wolbach, 1933).

Desde então que a acção dos retinóides, e em particular do ácido retinóico, tem sido exaustivamente estudada ao nível do desenvolvimento do pulmão (Mendelsohn, 1994; Desai, 2004; Wang, 2006; Pinto, 2010), da homeostase e reparação pulmonar (Torday, 2004; Shi, 2009), mas também na área da dermatologia, oncologia e desenvolvimento embrionário (De Luca, 1991; Goodman, 1984).

O nosso trabalho enquadra-se num conjunto de estudos da acção moduladora da vitamina A no desenvolvimento pulmonar, que há várias décadas vem sendo realizado no Instituto de Histologia e Embriologia da Universidade de Coimbra.

Este trabalho pretende verificar se existem diferenças entre géneros durante o desenvolvimento pulmonar, e estudar os efeitos da vitamina A no pulmão de cada género. Foi realizado durante a vida pré-natal dos murganhos, entre os dias de gestação E15 e E19, abrangendo três fases distintas do desenvolvimento pulmonar, a pseudoglandular, canalicular e sacular, e dirigindo-se principalmente para o estudo das fibras elásticas da matriz pulmonar.

A vitamina A foi injectada na gestante ao 14º dia de gestação, uma vez que existiam registos de alterações mesomélicas dos membros em fetos cujas mães haviam sido injectadas ao 11º dia de gestação (Alles, 1989, e em fetos de gestantes injectadas ao 12º e 13º dia de gestação, onde foi observada uma incidência de defeitos nos membros anteriores no dia E12 e uma maior incidência de defeitos nos membros posteriores nos injectados no dia E13 (Kochhar, 1973).

O dimorfismo sexual pulmonar observado nos ratos e murganhos é mais visível na altura da maturidade sexual (Massaro, 1995; Massaro, 2004a; Massaro, 2006; Patrone, 2003). As fêmeas virgens apresentam maior número de alvéolos, maior superfície alveolar e alvéolos com menores dimensões que os machos com a mesma idade, apesar de ambos terem a mesma necessidade de oxigénio (Massaro, 1995; Massaro 1996c; Massaro, 2006). A diferença de tamanho dos alvéolos é tão grande que pode ser facilmente observada ao microscópio (Massaro, 1995). Apesar de as fêmeas lactantes e gestantes necessitarem de um maior consumo de oxigénio, a superfície de trocas gasosas é semelhante ao das fêmeas virgens (Massaro, 1995).

Começámos por analisar, potenciais diferenças entre géneros ao nível do **peso corporal** dos fetos. Observámos que a linha de crescimento no grupo controlo, foi muito semelhante para ambos os géneros, não existindo diferenças estatisticamente significativas. No entanto, no dia de gestação E18, os machos destacaram-se um pouco, apresentando um peso corporal superior ao das fêmeas. No grupo com vitamina A aconteceu algo semelhante, isto é, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre géneros, sendo no dia E19 que o peso corporal dos machos foi maior que o das fêmeas.

Os dados obtidos não permitem concluir se existe um dimorfismo sexual no grupo controlo, no entanto mostraram pequenas diferenças entre géneros ao longo da gestação. Quanto ao grupo com vitamina A, as diferenças entre géneros parecem estar mais acentuadas, não sendo possível afirmar se a acção da vitamina se faz sentir mais nos machos ou nas fêmeas.

Ainda foi possível verificar que a vitamina A não exerceu qualquer efeito no peso fetal, uma vez que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e o grupo com vitamina A.

No estudo por **análise de imagem** foi realizada a **quantificação das fibras** elásticas e a determinação da área septal do pulmão fetal, o que possibilitou uma observação da arquitectura e do arranjo estrutural pulmonar.

Em ambos os géneros do **grupo controlo** foi observada uma diminuição progressiva da **área septal pulmonar** ao longo da gestação. O estudo comparativo entre géneros do grupo controlo permitiu observar algumas diferenças, mais precisamente nos dias de gestação E16, E18 e E19, com as fêmeas a apresentarem menor área septal que os machos.

O teor em **fibras elásticas** foi variando ao longo da gestação em ambos os géneros do **grupo controlo**, mas as variações foram semelhantes nos dois géneros. No entanto, não deixaram de ser observadas diferenças entre machos e fêmeas, sendo que nos dias E15 e E18, as fêmeas apresentaram mais fibras que os machos. Nos dias E16 e E19 o valor foi muito semelhante entre géneros, mas no dia E17 as fêmeas apresentaram menos fibras elásticas que os machos. Também se observaram diferenças no dia de gestação em que foi observado o valor máximo de fibras, que nas fêmeas ocorreu no dia E17 e nos machos no dia E15.

Quando determinámos a percentagem **de fibras elásticas por área septal**, foi possível verificar que ao longo da gestação, ambos os géneros do **grupo**

**controlo** aumentaram o valor percentual de fibras pulmonares. No que diz respeito à percentagem de fibras elásticas por grupo, os machos apresentaram valores superiores às fêmeas nos dias de gestação E16, E18 e E19, sendo semelhantes nos restantes dois dias.

Todos estes resultados, apontaram diferenças entre géneros nos dias de gestação E16, E18 e E19. Nestes dias as fêmeas apresentaram área septal menor e teor em fibras semelhante ou inferior aos machos, o que no final se traduz numa percentagem de fibras maior nas fêmeas que nos machos. Os dados parecem indicar ainda, que o rearranjo estrutural pulmonar nos machos e nas fêmeas ocorre em dias de gestação diferentes.

As variações da área septal pulmonar em ambos os géneros do **grupo com vitamina A** foram idênticas ao longo da gestação, tendo começado por baixar do dia E15 para o dia E16. Nos dias seguintes (E17 e E18), ambos os géneros mostraram um aumento da área septal, ao qual se seguiu uma redução (E19). Os valores de área septal entre géneros foram semelhantes nos dias E15 e E16, mas nos dias de gestação E17, E18 e E19 foram observadas diferenças, com as fêmeas a mostrarem menor área septal que os machos.

Em ambos os géneros do **grupo com vitamina**, foi possível observar um aumento progressivo ao longo da gestação do teor de **fibras elásticas** no pulmão fetal. As diferenças entre géneros ocorreram apenas nos dias de gestação E17, E18 e E19, com as fêmeas a apresentarem menos fibras elásticas pulmonares que os machos.

Quando determinámos a **percentagem de fibras elásticas** por área septal, observámos um aumento ao longo da gestação em ambos os géneros com vitamina A. Os valores determinados foram semelhantes nos pulmões fetais do sexo masculino e feminino entre os dias de gestação E15 e E18, mas no dia E19, as fêmeas apresentaram maior percentagem de fibras que os machos.

Estes resultados mostraram diferenças entre géneros no grupo com vitamina, ao nível da área septal e no teor em fibras elásticas nos dias de gestação E17, E18 e E19, no entanto, a determinação da percentagem de fibras por área septal apenas mostrou diferença entre sexos no dia E19. O que parece ter acontecido no grupo com vitamina A, foi que cada género fetal, manteve uma proporção entre a área septal e o teor em fibras elásticas de tal forma que a percentagem de fibras elásticas presentes no pulmão foi mantida. Este equilíbrio entre área septal e fibras não foi observado no grupo controlo, o que poderá resultar da acção da vitamina A.

As **fêmeas controlo** apresentaram maior área septal e um teor em fibras elásticas superior ao das **fêmeas com vitamina**, entre os dias de gestação E15 e E18 ( $p < 0,0001$ ). Nestes dias, a percentagem de fibras elásticas apenas foi diferente nos dias E15 e E17, com as fêmeas controlo a apresentarem um valor superior ao das fêmeas com vitamina.

No dia de gestação E19, as fêmeas controlo apresentaram uma área septal semelhante à das fêmeas com vitamina, mas o teor em fibras elásticas foi inferior ao das fêmeas com vitamina, o que determinou uma menor percentagem de fibras elásticas nas fêmeas controlo.

Estes resultados permitem considerar que durante os primeiros dias de gestação (E15 a E17), a acção da vitamina A nas fêmeas se direccionou para o rearranjo do parênquima pulmonar, não se tendo produzido tantas fibras elásticas. Mas no dia E19, onde poucas alterações foram observadas no parênquima pulmonar, o efeito da vitamina ocorreu no teor de fibras elásticas, aumentando a percentagem de fibras elásticas por área septal nas fêmeas com vitamina.

Entre os dias de gestação E15 e E17, os **machos controlo** apresentaram maior área septal e maior teor em fibras elásticas que os **machos com vitamina**, no entanto, foi apenas nos dias E15 e E17 que a percentagem de fibras foi superior á dos machos com vitamina. No dia E19, os machos controlo apresentaram uma área septal semelhante á dos machos com vitamina, mas um teor em fibras elásticas inferior ao dos machos com vitamina, o que determinou uma menor percentagem de fibras elásticas nos machos controlo ( $p < 0,0001$ ).

À semelhança das fêmeas, estes resultados permitem considerar que nos primeiros dias de gestação a vitamina promove o rearranjo estrutural no pulmão e que nos últimos dias da gestação promove a produção de fibras elásticas.

Em **resumo**, os resultados mostraram que no murganho existe um dimorfismo sexual na arquitectura e no teor em fibras elásticas do pulmão fetal, mais evidente nos últimos dias de gestação.

Ainda permite observar que nos primeiros dias de gestação a vitamina A parece conseguir atenuar esse dimorfismo, mas que perto do final da gestação (E19), as diferenças entre géneros voltam a surgir.

Quanto á forma de actuar da vitamina A, tudo indica que inicialmente se faz sentir principalmente ao nível da área septal, reduzindo o tecido intersticial e aumentando os futuros espaços respiratórios, mas para o final da gestação parece promover a elastogénese pulmonar.

Vários estudos mostraram que os retinóides estão envolvidos na indução da formação dos septos alveolares (Massaro, 1996b; Massaro, 2000a; Massaro, 2000b) e na síntese e deposição de elastina (Lui, 1993; McGowan, 1995; Massaro, 1996a; McGowan, 1997a; McGowan, 1997b; McGowan, 2000). Através da redução da área septal o nosso estudo corrobora os trabalhos anteriores e ainda consegue mostrar que a acção de redução da área septal não ocorre nos mesmos dias de gestação nos pulmões dos fetos do sexo masculino e feminino.

No estudo de quantificação da **elastina pulmonar por HPLC**, o **grupo controlo** apresentou variações ao longo da gestação e de acordo com o género fetal. Dos dias de gestação E15 a E18, o teor de elastina nas fêmeas foi aumentando progressivamente, diminuindo apenas no dia E19. Nos machos, o conteúdo de elastina foi aumentando desde o dia de gestação E15 ao E19.

Nos três primeiros dias de gestação, a comparação entre géneros do grupo controlo mostrou valores de elastina semelhantes nos dias E15 e E17, com apenas uma pequena diferença no dia E16, com um valor menor nas fêmeas. Nos últimos dias do estudo (E18 e E19) as diferenças acentuaram-se e as fêmeas apresentaram mais elastina que os machos ( $p < 0,0001$ ).

Podemos verificar que ao longo da gestação existiram mais oscilações no teor de elastina pulmonar nas fêmeas que nos machos, e que nos dias E18 e E19, existe um dimorfismo sexual pulmonar nos fetos do murganho.

No **grupo com vitamina A** também observámos variações no teor de **elastina** ao longo da gestação e de acordo com o género fetal. Até ao dia de gestação E18, as fêmeas com vitamina foram aumentando o conteúdo de elastina pulmonar, mas no dia E19 este valor baixou. Nos machos com vitamina ocorreram mais oscilações no teor de elastina, com um aumento do dia E15 para o dia E16, uma descida no dia E17, seguida de um aumento no dia E18 e descida no dia E19.

A comparação entre géneros do grupo com vitamina mostrou semelhanças no conteúdo de elastina apenas no dia E16, e diferenças nos restantes quatro dias, com as fêmeas a apresentarem um teor de elastina superior ao dos machos. Podemos assim considerar que existe dimorfismo sexual pulmonar no grupo com vitamina, e que estas diferenças entre géneros estão mais acentuadas que no grupo controlo, onde apenas foi perceptível nos dois últimos dias de gestação.

Entre os dias de gestação E15 e E18, as **fêmeas com vitamina** apresentaram mais elastina pulmonar que as **fêmeas controlo**, havendo uma

aproximação de valores no dia E19. Nos dias de gestação E15, E16, E18 e E19 os teores de elastina nos **machos com vitamina** também foram superiores aos dos **machos controlo**, sendo semelhantes no dia E17.

Estes resultados permitem-nos considerar que durante a gestação, a vitamina promoveu um aumento no teor de elastina no pulmão fetal, e ao que tudo indica, este aumento foi diferente em cada um dos géneros. Nas fêmeas a acção da vitamina ocorreu de uma forma progressiva ao longo do estudo, com pequenos aumentos em cada um dos dias de gestação, enquanto nos machos foram observadas variações ao longo da gestação, aumentando num dia e baixando no dia seguinte.

Em **resumo**, no murganho existe dimorfismo sexual pulmonar no teor de elastina, nos dias de gestação E18 e E19, com as fêmeas controlo a apresentarem mais elastina pulmonar que os machos. Também foi possível observar que nos machos o aumento de elastina foi gradual ao longo da gestação (E15 a E19), enquanto nas fêmeas se observaram maiores variações.

Num trabalho anterior realizado em murganhos foi observado um aumento continuado da elastina pulmonar durante a fase pré-natal (E15 e E19), mais intenso nos últimos dois dias de gestação (Rodrigues, 2008).

No que diz respeito á acção da vitamina A nesta fase da vida pré-natal, poderemos comprovar que consegue acentuar as diferenças entre géneros, mantendo as fêmeas com teores de elastina superiores aos dos machos e que promove a elastogénese no pulmão fetal.

No nosso trabalho não foi detectado **retinol no pulmão fetal** de ambos géneros **do grupo controlo**, entre os dias de gestação E15 e E19. Os resultados não permitem afirmar que não existe retinol no pulmão fetal do murganho, pois este poderá estar presente em valores tão baixos que não permitam a sua quantificação com a metodologia utilizada.

No **grupo com vitamina A** quantificámos **retinol pulmonar**, tendo sido observadas variações no seu conteúdo ao longo dos dias de gestação estudados, e de acordo com o género fetal.

Nas fêmeas com vitamina o retinol não foi detectado nos dias de gestação E15 e E18, o mesmo não sucedendo nos machos, que nos cinco dias de gestação estudados, apresentaram sempre retinol pulmonar. Nos dias E16 e E19 as fêmeas apresentaram teor de retinol superior ao dos machos ( $p < 0,0001$ ), mas no dia E17 os machos apresentaram um valor superior ao das fêmeas ( $p <$

0,0001). De referir ainda que em ambos os géneros, o valor máximo de retinol pulmonar quantificado foi detectado no dia de gestação E19.

Podemos verificar que no grupo com vitamina, os fetos do sexo masculino conseguiram acumular retinol no pulmão durante todos os dias da gestação, enquanto que as fêmeas apenas o fizeram nos dias de gestação E16, E17 e E19. De facto existe uma diferença significativa entre géneros ( $p < 0,0001$ ), o que pode ser entendido como dimorfismo sexual, mais evidente no último dia de gestação (E19), dia em que as fêmeas apresentaram mais do dobro do valor dos machos.

A quantidade de retinol no pulmão dos fetos do sexo masculino sofreu menos oscilações do que nas fêmeas, e os machos, à excepção do dia E17, foram acumulando cada vez mais retinol ao longo da gestação.

Os resultados mostram que durante os dias de gestação E15 a E19, a vitamina A materna não foi captada, metabolizada e acumulada no pulmão fetal da mesma forma por ambos os géneros do grupo com vitamina.

No **pulmão fetal do grupo controlo** foi quantificado **palmitato de retinilo** em ambos os géneros, havendo variações ao longo da gestação e de acordo com o género fetal. Apesar de mostrarem diferentes teores em palmitato, ambos os géneros apresentaram teores baixos até ao dia de gestação E16, que subiram no dia E17 e desceram no dia E18. No dia E19, observámos variações diferentes entre géneros, ou seja, o teor de palmitato desceu nas fêmeas, e aumentou nos machos.

Entre o dia de gestação E15 a E18, as fêmeas apresentaram mais palmitato de retinilo que os machos ( $p < 0,0001$ ), mas no dia E19 os valores nos dois grupos foram semelhantes. De referir ainda que o pico de palmitato de retinilo nos machos foi no dia E19 e nas fêmeas no dia E17.

Os resultados obtidos permitem verificar que entre os dias de gestação E15 e E18, as oscilações no palmitato de retinilo foram semelhantes entre géneros, no entanto, também mostram que existe dimorfismo sexual no teor de palmitato pulmonar. Durante estes dias (E15 a E18), parece existir maior capacidade para acumular palmitato no pulmão nas fêmeas que nos machos. No entanto, no último dia do nosso estudo (E19), as diferenças entre géneros acabaram por desaparecer, havendo equidade no teor de palmitato pulmonar nos dois grupos.

No **pulmão fetal do grupo com vitamina** também foi quantificado **palmitato de retinilo**, observando-se variações ao longo da gestação e de acordo com o género fetal. Apesar de apresentarem conteúdos de palmitato bem diferentes, foi possível observar entre os dias de gestação E15 e E18, variações

semelhantes em ambos os gêneros, isto é, uma subida no teor do palmitato de retinilo do dia de gestação E15 para o E16, seguida de uma descida no dia E17 e um aumento no dia E18. No entanto no dia E19, os machos mantiveram o aumento de palmitato, atingindo o seu pico neste dia, enquanto as fêmeas diminuíram a quantidade de palmitato no pulmão.

Foram evidentes as diferenças no teor de palmitato entre gêneros, com as fêmeas a apresentarem valores de palmitato de retinilo no pulmão mais elevados que os machos, entre os dias E15 e E18 ( $p < 0,0001$ ). No dia E19 as diferenças entre gêneros mantiveram-se, mas neste dia os machos exibiram valores de palmitato superiores aos das fêmeas ( $p < 0,0001$ ).

De facto, no grupo com vitamina A também existe dimorfismo sexual, bem mais visível e que se manteve durante os cinco dias do estudo, o que provavelmente resulta da diferente capacidade que cada género possui para adquirir, metabolizar e acumular retinóides no pulmão.

Os nossos resultados também mostraram que do dia E15 até ao dia E18, quer as fêmeas controlo quer as fêmeas com vitamina, conseguiram acumular mais palmitato de retinilo que os machos dos seus respectivos grupos ( $p < 0,0001$ ). No dia E19, as fêmeas controlo e as fêmeas com vitamina diminuíram o teor de palmitato pulmonar, enquanto nos machos controlo e machos com vitamina esse valor aumentou, sendo apenas no grupo com vitamina que as diferenças entre géneros se mantiveram ( $p < 0,0001$ ).

Estes dados além de comprovarem a existência de dimorfismo sexual nos dois grupos experimentais (controlo e com vitamina A), durante os dias de gestação E15 a E19, também mostram que a vitamina A consegue tornar mais nítido o dimorfismo sexual existente no grupo controlo.

Os valores de palmitato de retinilo nas fêmeas com vitamina A foram sempre mais elevados do que nas fêmeas controlo, à excepção do dia E17, o que comprova que os fetos do sexo feminino têm capacidade para captar a vitamina A materna, e que são capazes de a acumular no pulmão.

Os machos com vitamina também conseguiram valores de palmitato mais elevados do que os machos controlo em três dias de gestação. As excepções ocorreram no dia E15, onde o teor em palmitato foi semelhante, e no dia E17, em que o teor de palmitato foi mais baixo nos machos com vitamina do que nos machos controlo.

O que estes resultados nos parecem indicar é que as fêmeas conseguem captar e acumular palmitato no pulmão pouco tempo depois da administração

materna da vitamina, uma vez que no dia E15 já apresentaram mais palmitato que as fêmeas controlo. Além disso parecem conseguir fazê-lo um dia mais cedo que os machos, uma vez que no dia E15 os machos com vitamina ainda apresentaram um valor igual aos dos machos controlo.

Quanto à excepção observada no dia E17 em ambos os géneros do grupo com vitamina, isto é, menor teor em palmitato que o respectivo género do grupo controlo, provavelmente sucede devido às profundas mudanças estruturais existentes no pulmão durante a transição da fase canalicular para a sacular, o que acontece por volta do dia E17. O declínio no teor de retinóides pulmonares poderá indicar a sua mobilização para um determinado processo de desenvolvimento e organogénese fetal, que ocorrerá no murganho precisamente no dia de gestação E17.

**Em resumo**, o nosso trabalho mostrou que entre os dias de gestação E15 e E19 os fetos de murganho de ambos os géneros, ou não possuem retinol no pulmão ou apresentam quantidades tão baixas que foram indetectáveis pelo nosso método. Quando houve um aumento na quantidade de retinóides maternos, o que sucedeu com a administração materna de vitamina A no dia de gestação E14, os fetos de ambos os géneros conseguiram metabolizar e acumular a vitamina sobre a forma de retinol nos seus pulmões. Observámos que a capacidade de metabolizar e armazenar sobre a forma de retinol não foi igual para ambos os géneros, o mesmo acontecendo com a quantidade armazenada.

No entanto, num outro trabalho realizado em pulmão fetal de murganho, foi encontrado retinol no grupo controlo, entre os dias de gestação E14 e E19, sendo também observado um aumento significativo do retinol pulmonar após a administração de retinóides (Rodrigues, 2003).

O palmitato de retinilo no pulmão fetal do murganho variou ao longo da gestação, tendo sido visível um dimorfismo sexual entre os dias de gestação E15 e E18, mas que desapareceu no dia E19. As pequenas diferenças observadas entre o nosso estudo e o realizado por Rodrigues e colaboradores, no que diz respeito às flutuações do palmitato ao longo da gestação (Rodrigues, 2003), resultam do dimorfismo sexual observado no nosso estudo e da separação por géneros.

A administração materna de vitamina A, aumentou o teor de palmitato de retinilo no pulmão fetal e também acentuou o dimorfismo sexual existente no grupo controlo, evidenciando as diferenças entre géneros ao nível do metabolismo dos retinóides.

De referir que os teores de palmitato de retinilo no pulmão do grupo com vitamina, foram inferiores aos observados noutra trabalho em que se injectou a vitamina A na fêmea gestante ao dia E12 (Rodrigues, 2003). Esta comparação entre trabalhos, demonstra que o dia de administração da vitamina poderá ser importante para conseguir acumular um determinado teor em palmitato de retinilo que seja capaz de favorecer o desenvolvimento do pulmão fetal, embora até à presente data ainda não se conheça qual o teor ideal de palmitato.

Por último, o nosso estudo também indica que a partir do dia E15 e até aos últimos dias de vida pré-natal, há uma tendência para aumentar a concentração de retinóides no pulmão fetal do murganho. Em outros estudos realizados no pulmão fetal dos ratos, os ésteres de retinilo foram detectados no dia de gestação E14, e após o dia E15, a sua concentração foi aumentando rapidamente até atingir um pico por volta do dia E18, ao qual se seguiu um declínio, atingindo-se o valor mais baixo nos primeiros dias de vida pós-natal (Shenai, 1990a; McGowan, 1995; McGowan, 1997a). A partir do dia de vida pós-natal P2 os teores de retinóides aumentam mantendo-se elevados até ao dia P8 (McGowan, 1995).

No nosso trabalho não foi detectado **retinol no fígado fetal de ambos os géneros do grupo controlo**, entre os dias de gestação E15 e E19. Os resultados não nos permitem assegurar a inexistência de retinol no fígado fetal, uma vez que este poderá estar presente, mas com valores tão baixos que não permitam a sua quantificação com a metodologia utilizada.

No **fígado fetal do grupo com vitamina A** quantificámos retinol, observando-se variações ao longo da gestação e de acordo com o género fetal, não tendo sido detectado retinol em nenhum dos géneros no dia de gestação E15. Os machos apresentaram retinol no dia E16, aumentando e atingindo o pico no dia E17, começando a baixar progressivamente a partir desse dia. Nas fêmeas, o retinol só foi detectado no fígado no dia E17, subindo e atingindo o valor máximo no dia E18, voltando a descer no dia E19.

Os resultados obtidos mostraram diferenças entre géneros, bem visíveis durante os primeiros três dias de gestação (E15 a E17), em que as fêmeas ou não apresentaram retinol ou então esse valor foi bem inferior aos dos machos ( $p < 0,0001$ ). As diferenças continuaram no dia E18, com as fêmeas a aumentar o teor de retinol, enquanto os machos começavam a perder. No dia E19, ambos os géneros baixam o teor de retinol, no entanto a quantidade de retinol no fígado das fêmeas foi superior à dos machos ( $p < 0,0001$ ).

O dimorfismo sexual observado, resulta da diferença existente no processo de metabolismo do retinol no fígado fetal de cada género. Os dados também nos permitem observar que, embora os machos com vitamina conseguissem captar e acumular retinol no fígado primeiro que as fêmeas, também começaram a utilizar e perder retinol mais cedo que as fêmeas.

No **fígado dos fetos do grupo controlo** foram observadas variações no teor de **palmitato de retinilo** ao longo da gestação e de acordo com o género fetal. Nos machos controlo observou-se um aumento do dia E15 para o dia E16, que continuou progressivamente até ao dia E18, altura em que atingiu o pico, mas que desceu no dia E19. As fêmeas controlo começaram por baixar o valor em palmitato de retinilo do dia E15 para o dia E16, mas depois deste dia e até ao final do estudo, observou-se um aumento progressivo, atingindo o valor máximo no dia E19. De referir no entanto, que em todos os dias de gestação estudados, as fêmeas controlo apresentaram mais palmitato de retinilo do que os machos.

Estes resultados indicam diferenças entre os géneros, visíveis nos dias de gestação E15 e E16, com as fêmeas a apresentarem mais palmitato que os machos ( $p < 0,0001$ ), e embora a diferença fosse reduzida nos dias E17 e E18, voltou a surgir no dia E19, com um teor de palmitato mais elevado nas fêmeas que nos machos ( $p < 0,0001$ ).

No fígado do **grupo com vitamina A** também foram observadas variações no conteúdo de **palmitato de retinilo** ao longo da gestação e de acordo com o género fetal. Nos dias de gestação E15 e E16, o teor de palmitato de retinilo no fígado dos machos e das fêmeas foi semelhante, mas a partir desse dia, os valores ficaram diferentes em cada grupo, apesar de as variações terem sido idênticas nos dois grupos. De facto, nos machos com vitamina foi observado um aumento no palmitato do dia E15 para E16, uma descida no dia E17, à qual se seguiu um aumento no dia E18, dia em que atingiu o pico, e por fim uma descida no dia E19. Nas fêmeas as variações foram iguais, também atingindo o pico ao dia E18, no entanto a partir do dia E16, os teores em palmitato de retinilo no fígado foram sempre superiores aos dos machos ( $p < 0,0001$ ).

À semelhança do grupo controlo, estes dados também mostram a existência de dimorfismo sexual no grupo com vitamina. Neste grupo experimental, as diferenças entre géneros ficaram bem mais evidenciadas, provavelmente devido à forma como os fetos de cada sexo metabolizam e acumulam a vitamina A no seu fígado.

Os valores de palmitato de retinilo nos machos e fêmeas com vitamina foram sempre superiores aos dos machos e fêmeas controlo, o que indica que os fetos conseguem captar a vitamina A materna e armazená-la no seu fígado, o que no entanto, parece ser realizado de forma desigual em cada género. Com estes dados, podemos considerar que as fêmeas conseguem metabolizar e armazenar mais retinóides no fígado que os machos.

Em **resumo**, o nosso trabalho mostrou que existem variações no teor de retinóides no fígado fetal ao longo da gestação, o que vai de encontro aos resultados obtidos noutros trabalhos (Rodrigues, 2003; Rodrigues, 2004; Pinto, 2010), mas diferente dos dados obtidos por Shenai e colaboradores, em cujos fígados a concentração de ésteres de retinilo permaneceu constante durante o período pré-natal, só aumentando no período pós-natal (Shenai, 1990a).

Os teores de retinóides quantificados no nosso trabalho foram inferiores aos observados anteriormente (Rodrigues, 2003; Rodrigues, 2004), o que poderá resultar de uma amostragem tecidual menor e de uma administração mais tardia de vitamina A.

O estudo evidenciou a existência de diferenças entre géneros no que diz respeito ao teor de retinóides no fígado, diferença que foi observada em ambos os grupos experimentais, mas que foi bem mais nítida entre os géneros do grupo com vitamina A. Os dados indicam um dimorfismo sexual, que resultará da diferente forma como machos e fêmeas metabolizam, acumulam e processam os retinóides do fígado, o que sem dúvida poderá ser importante para o desenvolvimento fetal e mais em particular para o desenvolvimento pulmonar.

A responsabilidade dos **estrogénios** no dimorfismo sexual pulmonar dos roedores, ficou comprovada com alguns trabalhos realizados por Massaro e colaboradores (Massaro 1996c; Massaro, 2004a; Massaro, 2006). A remoção dos ovários ao dia de vida pós-natal P21, provoca uma redução no número de alvéolos, um aumento da dimensão dos alvéolos e uma redução na superfície alveolar (Massaro 1996c; Massaro, 2004a). Se submetermos estas fêmeas a terapia de substituição com estrogénios, podemos verificar que as alterações são menos danosas do que nas fêmeas sem terapia, o que evidencia o efeito dos estrogénios (Massaro 1996c).

Para compreender a acção dos estrogénios torna-se fundamental o estudo dos dois únicos receptores de estrogénios identificados nos mamíferos. Os receptores de estrogénios alfa ( $ER\alpha$ ) e beta ( $ER\beta$ ), pertencem à superfamília de

receptores nucleares que actuam como factores de transcrição dependentes do ligando e que têm um papel importante em vários processos, nomeadamente na regulação do sistema reprodutivo e cardiovascular, na regulação da densidade óssea e na inflamação (Green, 1986; Morani, 2008). Estas duas isoformas têm uma estrutura similar, partilhando 94% dos aminoácidos que formam o domínio de ligação ao DNA e 53% dos aminoácidos do domínio de ligação ao ligando (Morani, 2008), mas apresentam diferente expressão tecidual (kuiper, 1997) e exibem funções biológicas distintas (Couse, 1997; Kawai, 2005).

O ER $\alpha$  apenas está expresso nos tecidos considerados sensíveis ao estrogénio, enquanto o ER $\beta$  também está no epitélio pulmonar (Patrone, 2003), próstata ventral (Weihua, 2001) e células da granulosa (Cheng, 2002).

Aparentemente, o ER $\beta$  está envolvido em importantes processos fisiológicos como a diferenciação, organização da matriz extracelular e comunicação estroma-epitélio (Koehler, 2005). Quando os dois receptores são expressos no mesmo tecido, como glândula mamária, útero e sistema imune. o ER $\alpha$  promove a proliferação enquanto o ER $\beta$  tem funções pró-apoptóticas e pro-diferenciadoras (Morani, 2008).

No nosso estudo imunocitoquímico dos receptores de estrogénios pretendíamos observar a expressão dos receptores ER $\beta$  e ER $\alpha$  no pulmão fetal pré-natal, saber a sua localização celular, detectar eventuais diferenças entre géneros e estudar a potencial acção da vitamina A nestes receptores.

Quanto ao **receptor de estrogénios ER $\alpha$** , verificámos que não existia expressão no pulmão fetal dos murganhos em ambos os géneros do grupo controlo, o mesmo acontecendo nos fetos do grupo com vitamina A. Num estudo imunocitoquímico realizado com embriões e fetos de porco, também não foi observada expressão pulmonar do receptor ER $\alpha$  (Knapczyk, 2008).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados no pulmão adulto de murganho, onde não foi detectada expressão do receptor ER $\alpha$ , sendo encontrado apenas o ER $\beta$  no epitélio brônquico (células ciliadas e não ciliadas) e na região alveolar (células alveolares tipo I e II) (Patrone, 2003; Morani, 2008). Ao que tudo indica, no pulmão adulto do murganho, o receptor ER $\beta$  deverá ser o mediador do efeito dos estrogénios, e portanto o principal determinante do fenótipo pulmonar das fêmeas (Patrone, 2003; Massaro 2004; Massaro, 2007).

Num estudo realizado entre a 13<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana de vida do desenvolvimento fetal humano, não foi detectado RNAm do receptor ER $\alpha$  no pulmão fetal

(Takeyama, 2001), mas foi possível presenciar RNAm do ER $\alpha$  no útero e com um sinal mais fraco, no ovário, testículo, pele e estômago (Brandenberger, 1997).

O facto de os animais com mutação homozigótica do gene ER $\alpha$  conseguirem sobreviver até à vida adulta, embora sejam inférteis e apresentem os sistemas genitais alterados, sugere que durante a vida fetal a função exercida pelo receptor alfa teve de ser substituída (Lubahn, 1993).

Os nossos resultados permitem-nos considerar que durante o desenvolvimento pulmonar do murganho o receptor beta (ER $\beta$ ) será o único mediador da acção dos estrogénios no pulmão.

Quanto ao **receptor de estrogénios ER $\beta$** , foi possível detectar a sua expressão no pulmão pré-natal do murganho em ambos os grupos experimentais, tendo sido observadas diferenças importantes. No nosso estudo, as células pulmonares que apresentaram expressão do receptor ER $\beta$  foram as células mesenquimatosas e as células epiteliais, resultado semelhante ao observado num outro trabalho, realizado com fetos de porco (Knapczyk, 2008).

Os nossos resultados mostram que existe expressão do receptor ER $\beta$  durante a fase pré-natal do desenvolvimento pulmonar e que esta expressão muda ao longo da gestação. De facto, durante o desenvolvimento fetal humano foi detectada a presença de RNAm do ER $\beta$  em vários tecidos, sendo o nível de expressão mais elevado na glândula adrenal e nos sistemas reprodutivos feminino e masculino, e os níveis mais baixos no cérebro, coração, pulmão e rim (Takeyama, 2001).

No pulmão fetal das **fêmeas do grupo controlo**, foi encontrado receptor ER $\beta$  logo no dia de gestação E15, e até ao final do nosso estudo (E19) foi mantida imunomarcção positiva. Nos **machos**, o receptor só começou a ser observado no dia E16, portanto um dia mais tarde que nas fêmeas, mas também manteve a imunomarcção até ao dia E19. Em ambos os géneros a localização celular do receptor foi visível nas células mesenquimatosas e células epiteliais de revestimento das futuras porções condutoras e futuras áreas alveolares, tendo sido observadas variações ao longo da gestação. Nas fêmeas observámos imunomarcção simultânea das células mesenquimatosas e epiteliais apenas no dia E15, mas no macho ocorreu nos dias E16 e E17. Nos restantes dias, isto é, do dia E16 a E19 nas fêmeas e E18 e E19 nos machos, apenas se observaram imunomarcções nas células epiteliais de revestimento.

A percentagem de células epiteliais imunomarcadas foi variando ao longo da gestação, atingindo o seu valor máximo no dia E19 em ambos os géneros, tendo sido observado que em alguns dias de gestação, as fêmeas apresentaram valores ligeiramente superiores aos dos machos ( $p > 0,0001$ ).

A comparação entre géneros do grupo controlo, evidencia diferenças e demonstra que no pulmão dos fetos do sexo masculino a expressão do receptor ER $\beta$  é mais tardia que nos fetos do sexo feminino. Estes resultados permitem verificar a existência de um dimorfismo sexual na expressão pulmonar do ER $\beta$ .

No **grupo com vitamina A**, conseguimos detectar imunomarcação para o receptor ER $\beta$  desde o dia de gestação E15 ao dia E19, nos pulmões dos fetos do sexo feminino e masculino. A localização celular da imunomarcação surgiu nas células mesenquimatosas e células epiteliais das futuras porções condutoras e futuras áreas alveolares e variou ao longo da gestação, um pouco à semelhança do observado no grupo controlo.

Nas **fêmeas com vitamina** foi observada imunomarcação simultânea do receptor ER $\beta$  nas células epiteliais e mesenquimatosas nos dias E15 e E16, o que nos machos aconteceu nos dias E15, E16 e E17. Também verificámos que a percentagem de células epiteliais imunomarcadas nas fêmeas foi sempre menor, mas sem valor estatístico ( $p > 0,0001$ ).

Estes resultados parecem mostrar uma menor diferença entre machos e fêmeas do grupo com vitamina, quando comparado com a diferença entre géneros do grupo controlo. Esta menor diferença foi bem evidente nos dias de gestação de expressão de ER $\beta$ , com ambos os géneros a expressarem o receptor beta do dia E15 ao dia E19, mas também foi visível ao nível da intensidade e localização celular da imunomarcação.

A comparação entre **fêmeas do grupo controlo e fêmeas com vitamina** mostrou ligeiras diferenças na localização celular do receptor ER $\beta$ . As fêmeas controlo apresentaram imunomarcação simultânea das células mesenquimatosas e epiteliais somente no dia E15, enquanto as fêmeas com vitamina o fizeram nos dias E15 e E16. Também foram observadas diferenças na percentagem de células epiteliais, sempre mais baixas nas fêmeas controlo, mas apenas com valor estatístico no dia de gestação E17.

A comparação entre **machos controlo e machos com vitamina** apontou a mesma localização celular e intensidade da imunomarcação. No que diz respeito à percentagem de células epiteliais marcadas positivamente, os machos controlo

apresentaram um valor inferior ao dos machos com vitamina durante toda a gestação ( $p < 0,0001$ ). No entanto, o dado mais relevante da comparação entre os machos dos dois grupos, foi o facto de os machos controlo não apresentarem expressão do receptor ER $\beta$  no dia E15, e de neste mesmo dia ter sido detectada nos machos com vitamina.

Os resultados permitem considerar que a vitamina A terá exercido alguma acção na expressão pulmonar do ER $\beta$  e que esta foi diferente de acordo com o sexo dos fetos. No pulmão dos fetos do género masculino a acção da vitamina A, permitiu a expressão antecipada do ER $\beta$ , logo ao dia E15, e aumentou o número de células epiteliais imunomarcadas. No pulmão dos fetos do género feminino a acção da vitamina A foi menos evidente, apenas com um ligeiro aumento no número de células imunomarcadas.

Em **resumo**, os dados do nosso estudo permitem considerar que no desenvolvimento pré-natal do pulmão do murgancho, o ER $\beta$  foi o único receptor envolvido na mediação do sinal dos estrogénios, apesar de sabermos que ambos os receptores são necessários para o desenvolvimento pulmonar (Massaro, 2004a; Massaro, 2006). De facto nos murganchos com mutação ER $\alpha^{-/-}$ , e nos murganchos com mutação ER $\beta^{-/-}$ , foram observados alvéolos maiores e em menor número que nos animais normais (Massaro, 2004a; Massaro, 2006), o que comprova a importância de ambos no desenvolvimento pulmonar. O que também parece acontecer é que a forma de mediação dos receptores será diferente, já que nos animais ER $\beta^{-/-}$ , se observaram defeitos na matriz extracelular, com diminuição do tecido elástico, o que não foi observado nos animais ER $\alpha^{-/-}$  (Massaro, 2004a; Massaro, 2006).

Os resultados também possibilitam verificar a existência de **dimorfismo sexual** na expressão pulmonar do receptor ER $\beta$  durante o desenvolvimento pré-natal do pulmão do murgancho e ainda permitem considerar que **a vitamina A** consegue esbater algumas das diferenças observadas entre géneros, ao interferir com a expressão do receptor beta, antecipando-a no sexo masculino.

Se considerarmos que a acção dos estrogénios mediada pelo receptor ER $\beta$  tem uma acção importante no desenvolvimento da matriz extracelular do pulmão (Massaro, 2004a; Massaro, 2006) e que modifica a expressão do PDGF-A (factor de crescimento derivado das plaquetas), o que por sua vez altera a proliferação, migração e deposição de elastina, influenciando assim a alveologénese (Patrone,

2003), então o dimorfismo sexual observado na expressão deste receptor pode fazer diferença no desenvolvimento pulmonar.

O facto de os fetos do género feminino expressarem receptor ER $\beta$  um dia mais cedo que os machos, permitirá uma mediação adiantada da acção dos estrogénios, que poderá influenciar a diferenciação e/ou desenvolvimento pulmonar.

The image shows a microscopic view of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The tissue exhibits a complex, fibrous structure with various cellular components. A large white rectangular box is superimposed on the right side of the image, partially obscuring the underlying tissue. The word "Conclusões" is written in the top left corner of this white box.

## Conclusões

A compreensão da morfogénese pulmonar, o conhecimento dos processos de diferenciação estrutural do pulmão na vida pré natal, e a acção de determinados factores no seu desenvolvimento, são de extrema importância para o pulmão, um órgão que termina a sua maturação estrutural e funcional na vida pós-natal.

Numerosos estudos mostram como a vitamina A e seus derivados, são importantes no mecanismo de morfogénese pulmonar e na expressão de um conjunto de componentes indispensáveis à estrutura e funcionamento do pulmão.

Na última década, o Instituto de Histologia e Embriologia da Universidade de Coimbra tem vindo a desenvolver um conjunto de estudos sob a acção moduladora da vitamina A no desenvolvimento pulmonar, com especial atenção à componente fibroelástica do pulmão. As fibras elásticas são um componente da matriz extracelular importante para o pulmão, pois conferem a elasticidade que o pulmão necessita para o seu funcionamento. A sua quantidade e interacção com os vários elementos tecidulares, determinarão a arquitectura, função e biomecanismos do pulmão.

Este trabalho, que pretende ser mais um contributo para o estudo histomorfológico dos efeitos da administração materna da vitamina A no pulmão pré-natal, teve uma vertente inovadora, ao realizar o estudo comparativo entre géneros e ao estudar uma eventual acção diferenciada da vitamina A na morfogénese do pulmão feminino e masculino.

Os nossos resultados mostram dimorfismo sexual na arquitectura e no teor em fibras elásticas no pulmão fetal do murganho durante a vida pré-natal, mais evidente nos últimos dois dias de gestação (E18 e E19).

A vitamina A parece conseguir acentuar esse dimorfismo, sobretudo nos últimos dias de gestação. Ao que tudo indica, nos primeiros dias de gestação estudados, a vitamina actua principalmente ao nível da área septal, reduzindo o tecido intersticial e aumentando os futuros espaços respiratórios, mas nos últimos dias parece promover a elastogénese pulmonar.

Ao nível do teor de elastina pulmonar também foi observado dimorfismo sexual, mais evidente nos últimos dias de gestação (E18 e E19), com as fêmeas a apresentarem mais elastina pulmonar que os machos. A vitamina A acentua as diferenças entre géneros, mantendo as fêmeas com teores de elastina superiores

aos dos machos, sendo também visível o seu efeito na promoção da elastogénese pulmonar.

Em ambos os géneros do grupo controlo, não foram detectados níveis de retinol no pulmão fetal, sendo apenas quantificado palmitato de retinilo. Foi observado dimorfismo sexual nos primeiros quatro dias de gestação, que desapareceu no dia E19. A administração materna de vitamina A, acentuou o dimorfismo sexual existente no grupo controlo, permitiu a acumulação de retinol no pulmão e mostrou a existência de diferenças entre géneros ao nível do metabolismo dos retinóides. O nosso estudo também indica que a partir do dia E15 e até aos últimos dias de vida pré-natal, há uma tendência para aumentar a concentração de retinóides no pulmão fetal do murganho.

Ao nível do fígado também foram observadas diferenças entre géneros no que diz respeito ao teor de retinóides, o que foi verificado em ambos os grupos experimentais, sendo mais nítido no grupo com vitamina A. Os dados indicam que os fetos do sexo feminino e masculino metabolizam, acumulam e processam os retinóides do fígado de forma diferente.

O estudo imunocitoquímico dos receptores de estrogénios revelou que durante o desenvolvimento pré-natal do pulmão do murganho, apenas o receptor  $ER\beta$  esteve envolvido na mediação do sinal dos estrogénios. Também possibilitaram verificar a existência de dimorfismo sexual na expressão pulmonar do receptor  $ER\beta$  e ainda considerar que a vitamina A consegue esbater algumas das diferenças observadas entre géneros, ao interferir com a expressão do receptor beta, antecipando-a nos fetos do sexo masculino.

Alguns trabalhos mostram que a acção dos estrogénios mediada pelo receptor beta tem efeito importante no desenvolvimento da matriz extracelular, em especial no tecido elástico pulmonar. Neste contexto, o dimorfismo sexual observado na expressão do  $ER\beta$  poderá influenciar a diferenciação e/ou desenvolvimento pulmonar.

Alguns estudos mostram que as crianças do género masculino apresentam maior risco de morte neonatal que as crianças do género feminino, ficando a dúvida se esta desvantagem masculina se deve a processos específicos da doença que surgem após o nascimento, ou se é uma característica específica do género masculino.

Torna-se assim pertinente estudar o dimorfismo sexual a nível do desenvolvimento pulmonar, não só porque a grande parte das doenças na vida

neonatal ocorrem no sistema respiratório, mas também porque podem existir diferenças no desenvolvimento pulmonar.

O nosso estudo consegue mostrar a existência de dimorfismo sexual durante o desenvolvimento pulmonar do murganho, bem patente nas diferenças ao nível da arquitectura e no componente elástico da matriz extracelular. A vitamina A, com reconhecida acção na morfogénese pulmonar, parece conseguir interferir nesse dimorfismo, acentuando as diferenças entre géneros. Esta acção diferenciada da vitamina, pode ser explicada pela diferente capacidade de metabolização dos retinóides que existe nos fetos do género masculino e feminino, e que sem dúvida poderá ser importante para o desenvolvimento fetal, em particular para o desenvolvimento pulmonar.

O facto de os teores em retinóides no pulmão e fígado do nosso trabalho serem inferiores aos de outros autores, demonstra que a escolha do dia de administração da vitamina poderá ser importante para conseguir acumular um determinado teor em retinóides que seja favorável ao desenvolvimento do pulmão fetal, embora até à presente data ainda não se conheça qual o teor ideal.

O estudo também mostrou um dimorfismo sexual na expressão do receptor de estrogénios ER $\beta$ , e que a vitamina A altera a sua expressão. Sabendo da importância dos estrogénios na manutenção e homeostase do pulmão feminino adulto, o nosso trabalho sugere que os estrogénios poderão favorecer o desenvolvimento pulmonar fetal.

O nosso trabalho será mais um importante contributo para a futura compreensão do desenvolvimento pulmonar e dos factores que nele participam. Ao mostrar a existência de dimorfismo sexual pulmonar no murganho, sem dúvida que se abre uma nova perspectiva para o estudo do desenvolvimento e das patologias pulmonares.

The image shows a microscopic view of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The tissue exhibits a complex, fibrous structure with various cellular components. A large, white rectangular box is overlaid on the right side of the image, partially obscuring the underlying tissue. The text "Resumo/Summary" is positioned at the top left corner of this white box.

Resumo/Summary

## Resumo

Este trabalho insere-se num conjunto de estudos da acção moduladora da vitamina A no desenvolvimento pulmonar, que há algumas décadas tem sido realizado no Instituto de Histologia e Embriologia da Universidade de Coimbra.

O seu objectivo, foi estudar potenciais diferenças estruturais existentes durante o desenvolvimento embrionário pulmonar de fetos do género masculino e feminino, e uma eventual acção diferenciada da vitamina A na morfogénese do pulmão feminino e masculino.

O estudo que decorreu entre os dias de gestação E15 e E19, abrangeu três fases distintas do desenvolvimento pulmonar, a pseudoglandular, canalicular e sacular. O trabalho focou-se principalmente no arranjo estrutural e quantificação das fibras elásticas pulmonares, bem como na quantificação da elastina. Foi ainda realizado uma análise do metabolismo dos retinóides, através da quantificação do retinol e palmitato de retinilo no pulmão e fígado fetal, e como procurávamos diferenças entre géneros, efectuámos o estudo imunocitoquímico da expressão dos receptores de estrogénios ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) no pulmão fetal do murganho.

No modelo experimental foram utilizados murganhos adultos de ambos os sexos, adquiridos numa instituição credenciada e mantidos de acordo com a legislação em vigor para a saúde e bem-estar animal. Estabelecemos dois grupos principais: o grupo controlo, constituído por fetos obtidos a partir de uma gestação sem qualquer tipo de manipulação e o grupo com vitamina A, formado por fetos obtidos a partir de uma gestação com administração de vitamina A ao 14º dia de gestação. Cada um destes grupos, foi subdividido por géneros, formando assim os quatro grupos finais. Após a colheita dos fetos e a remoção do pulmão e fígado, procedemos à determinação dos géneros fetais e os órgãos foram processados de acordo com o tipo de estudo que pretendíamos realizar.

Os resultados obtidos permitem-nos considerar que existe um dimorfismo sexual na arquitectura, no teor em fibras elásticas e no teor de elastina no pulmão fetal do murganho, mais evidente nos dois últimos dias de gestação (E18 e E19).

Os dados indicam que a vitamina A acentua essas diferenças entre géneros, quer ao nível do arranjo estrutural quer ao nível do teor de fibras elásticas e de elastina pulmonar.

No que diz respeito à quantificação dos retinóides no pulmão, mais precisamente no teor de palmitato de retinilo, uma vez que não detectámos

retinol no pulmão, foi possível observar um dimorfismo sexual, que com a administração materna de vitamina A, ficou mais evidente. No fígado foram quantificados ambos os retinóides e os resultados foram semelhantes aos anteriores. Este estudo ainda permitiu verificar que a capacidade de captação, armazenamento e metabolização dos retinóides, não será realizada de igual forma por ambos os géneros.

O estudo imunocitoquímico mostrou que durante o desenvolvimento pulmonar do murganho, o receptor beta ( $ER\beta$ ) foi o único mediador da acção dos estrogénios, pois não foi detectada expressão do receptor ER alfa ( $ER\alpha$ ). Além disso, foi possível observar a existência de dimorfismo sexual na expressão do receptor beta ( $ER\beta$ ) e diferenças na sua expressão sob a acção da vitamina A.

Em conclusão, durante o desenvolvimento pulmonar do murganho existe dimorfismo sexual, mais evidente nos últimos dias de gestação, e no qual a vitamina A parece conseguir interferir.

## Summary

This work is part of a series of studies of the modulator action of vitamin A on lung development that has been conducted in the last few decades at the Institute of Histology and Embryology, University of Coimbra.

Its aim was to study potential structural differences between males and females fetuses during prenatal lung development, and a possible different action of vitamin A in lung morphogenesis of males and females.

The study occurred between gestation days E15 and E19, comprising three distinct stages of lung development, the pseudoglandular, canalicular and saccular. The work focused mainly on the lung structural arrangement and quantification of pulmonary elastic fibers, as well as the quantification of elastin. We also carried out a retinoids metabolism analysis, by the quantification of retinol and retinyl palmitate in fetal lung and liver, and since we were looking for gender differences, we have done an immunocytochemistry study of the estrogen receptors (ER  $\alpha$  and ER  $\beta$ ) expression in fetal lung.

In the experimental model were used adult mice of both sexes, acquired in an accredited institution and maintained in accordance with current legislation for health and animal welfare. We establish two main groups: the control group, consisting of fetuses obtained from pregnant females without any manipulation and vitamin A group, composed of fetuses from pregnant females submitted to the administration of vitamin A in the gestation day E14. Each of these groups was subdivided by gender, thus establishing the four final groups. After removing the fetuses and their lung and liver, we determined their gender and the organs were processed according to the type of study.

The results obtained allow us to conclude that exists a sexual dimorphism in the lung architecture and in the elastic fibers and elastin content in fetal lung of mice, most evident in the last two gestation days (E18 and E19).

The data also indicate that vitamin A enhances these gender differences, in terms of lungs structural arrangement and in the level of elastic fibers and elastin.

In the quantification study of retinoids in the control lung, retinol was undetected and retinyl palmitate levels exhibit sexual dimorphism. In the vitamin A groups, we detected retinol and retinyl palmitate and we observed a more evident sexual dimorphism. In the liver both retinoids were quantified and the results were similar to previous ones. This study also has shown that the ability to capture,

storage and metabolize retinoids will not be made in the same way by both genders.

The immunocytochemistry study showed that during the mice lung development, the receptor beta (ER  $\beta$ ) was the only mediator of estrogen action, because we did not detect any expression of receptor alpha (ER  $\alpha$ ). Moreover, we observed the existence of sexual dimorphism in the expression of the receptor beta (ER  $\beta$ ) as well as differences in their expression under the action of vitamin A.

In conclusion, there is sexual dimorphism during mice lung development, more evident in the last gestation days, and that vitamin A appears to be able to interfere in these gender differences.



## Apêndice Técnico

- 7.1. Preparação do material histológico
  - 7.1.1. Processamento histológico
  - 7.1.2. Coloração hematoxilina-eosina
- 7.2. Quantificação das fibras elásticas por análise de imagem
  - 7.2.1. Técnica de coloração das fibras
  - 7.2.2. Análise de imagem
- 7.3. Quantificação da elastina por HPLC
  - 7.3.1. Fase de extracção, hidrólise, separação e purificação
  - 7.3.2. Derivatização e análise cromatográfica
  - 7.3.3. Determinação da proteína total
- 7.4. Quantificação do retinol e palmitato de retinilo por HPLC
- 7.5. Técnica imunocitoquímica
  - 7.5.1. Receptor ER alfa
  - 7.5.2. Receptor ER beta

## 7.1 Preparação do material histológico

### 7.1.1. Processamento histológico

#### Equipamentos

Processador “Shandon® Citadel 2000”	Micrótomo “Leica® RM 2125 RT”
Máquina de inclusão “Medite® TES 99”	Placa de frio Medite® TES 99”
Banho 1052GFL	Placa quente ElectroThermal
Medidor de pH “Beckman® Φ320”	Estufa a 60°C “Heraeus” RB350

#### Reagentes

Etanol – AGA	Formaldeído – Merck®
Xilol – J. T. Baker	Lisina - Sigma®
Parafina – Shandon Histoplast- Thermo Scientific	

#### Material

Lâminas de vidro- Menzel-Glaser  
Facas de micrótomo - Feather

### 7.1.2. Coloração de Hematoxilina-Eosina

#### Reagentes

Etanol – AGA	Formaldeído – Merck®
Xilol – J. T. Baker	Hematoxilina - Merck®
Eosina – Riedel-de-Haen	Alúmen de potássio - Merck®
Ácido cítrico - Merck®	Hidrato de cloral - Merck®
Iodato de sódio - Merck®	Ácido acético - Merck®

#### Preparação dos corantes

Eosina a 1%

Dissolver 1g de eosina em 100ml de água destilada, agitando bem. Filtrar a solução e quando pretendermos usar a solução corante adicionamos 2 a 3 gotas de ácido acético.

Hematoxilina

Dissolver 1g de hematoxilina, 50g de alúmen de potássio e 0,2g de iodato de sódio num litro de água destilada, aquecendo e agitando a solução para facilitar a dissolução dos reagentes. Juntar 50g de hidrato de cloral e 1g de ácido cítrico, deixando ferver durante 5 minutos. Deixar arrefecer e filtrar a solução corante.

## 7.2. Quantificação das fibras elásticas por análise de imagem

### 7.2.1. Coloração das fibras elásticas

#### Equipamentos

Estufa a 60°C “Heraeus” RB350  
Medidor de pH “Beckman® Φ320”

Destilador “GFL® modelo 2001/4”  
Balanças “Kern®, EG300-3M”

#### Reagentes

Ácido clorídrico - Sigma® Chemical  
Etanol – AGA  
Iodo – Merck®  
Pararosanilina – Sigma® Chemical

Bissulfito de sódio – Merck®  
Iodeto de potássio – Merck®  
Paraldeído – M&B  
Xilol – J. T. Baker

#### Material

Lamelas- VWR  
Meio de montagem (DPX) - Fluka®

#### Preparação das soluções

Solução Lugol (2% p/v) - Dissolver 2g de Iodo e 4g de iodeto de potássio em 100 ml de água destilada, seguida da diluição adequada para a técnica.

Solução aquosa de bissulfito de sódio a 5% p/v - Dissolver 5g de bissulfito de sódio em 100 ml de água destilada.

Álcool Clorídrico a 1%, v/v - Colocar 1 ml de ácido clorídrico em 99 ml de álcool 70%.

Solução corante - Dissolver 0,5g de pararosanilina em 200ml de etanol 70% e depois filtrar. Adicionar 2ml de ácido clorídrico e 2ml paraldeído, ficando em repouso durante 48 horas à temperatura ambiente. O corante deve escurecer progressivamente até ficar púrpura escura. Manter a 4°C.

### 7.2.2. Análise de imagem

#### Equipamentos

Microscópio – Nikon Optiphot  
Sistema fotográfico – Olympus DP50  
Computador acoplado ao microscópio – Macintosh G3  
Computador para tratamento de imagem - Macintosh G3

#### Programas

Studio Lite ®1.0 (para captar as imagens)  
Adobe Photoshop ®6.0 (para aperfeiçoar as imagens)  
Image ®1.3.6 (para quantificar as imagens)

### 7.3. Quantificação da elastina por HPLC

#### 7.3.1. Fase de extracção, hidrólise, separação e purificação

##### Equipamentos

Homogeneizador rotativo de lâminas de alta rotação, accionado por sistema de velocidade regulável “Ystral T1500

Centrifuga refrigerada “Beckman®, J-21B”, com rotor “J20”

Vortéx Unimag ZX

Banho-maria com agitação e temperatura reguláveis “Retsch”

Estufa a 60°C- 65°C “Heraeus” RB350

Estufa a 120°C “Ehret® TK4114”

Liofilizador “Kinetics®, modelo “Flexy-dry MNL-028-A”

##### Reagentes

Acetona – Riedel-de Haen®

Ácido acético glacial - Panreac®

Ácido clorídrico – BDH® Chemicals

Ácido tricloroacético – Merck®

Celulose – Sigma® Chemical

Cloreto de dansilo - Sigma® Chemical

Hidrogenocarbonato de sódio - Merck®

n-butanol - Merck®

Desmosinas/isodesmosinas- EPC-Elastin Products Co, Inc., MD 687

Elastina – “EPC-Elastin Products Co, Inc., Ref.E60

##### Preparação de soluções

Fase móvel - constituída por uma mistura de n-butanol/ácido acético/água ultra-pura na proporção de 4:1:1.

Fase estacionária - dissolução de 1g de celulose em 20 ml de fase móvel.

#### 7.3.2. Derivatização e Análise cromatográfica

##### Equipamentos

Duas bombas de alta pressão “Gilson®, modelos 305 e 302”

Misturador “Gilson®, 811B”

Módulo manométrico “Gilson®, 805

Injector “Rheodine®, modelo 7125” com sensor de injeção “Rheodine®”, referencia 7161, equipado com loop “Rheodine®” de 100µl

Sistema de pré coluna “Nucleosil® 120-5 C18” e coluna “Waters® Spherisorb, S5 ODS2” (150x4,6mm)

Seringas “Hamilton®” de 500 µl de capacidade

Detector “Gilson®, 115 UV” de comprimento de onda variável

Programa “Gilson®, Unipoint™, v1.9, System Software”

Computador com sistema operativo "Microsoft, Windows 95" ligado a um monitor de 17" e impressora "Epson® Stylus Color 440"

### **Reagentes**

Acetonitrilo – 637G21 SDS®

Di-hidrogenofosfato de potássio - Merck®

### **Preparação de soluções**

Para preparar as fases A e B, é necessário fazer uma solução aquosa de di-hidrogenofosfato de potássio 25mM e de ácido acético 25mM. A fase A, é o resultado de uma mescla da solução anterior com acetonitrilo na proporção 85:15 v/v respectivamente e a fase B, o resultado da mistura dos mesmos compostos na proporção de 40:60 v/v. Utilizando o KOH ajustamos o pH das soluções para um valor de 7,2 e depois filtramos a solução usando vácuo.

### **Outros equipamentos utilizados em diversos procedimentos**

Medidor de pH "Beckman® Φ320"

Balanças "Mettler®, H54, e "Kern®, EG300-3M

Destilador "GFL® modelo 2001/4"

Sistema de água ultra-pura "Sation® 9000

Bico de Bunsen

Pipeta de Gilson

### **Outros materias utilizados em diversos procedimentos**

Pontas para pipetas de Gilson

Tubos coréx 15 ml

Tubos de ensaio

Eppendorfs

Pipetas de plásticos

Ampolas de vidro

Fibra de lã

### **7.3.3. Determinação da proteína total**

#### **Equipamentos**

Vortéx Unimag ZX

Minicentrífuga - Costar modelo 10 MVSS

Espectrofotómetro – ThermoSpectronic® Hélios γ UV visible

Computador – sistema operativo Windows XP, monitor 17"

Programa Thermo Spectronic®, VisionPro™ software, v2.02

Impressora – Epson® Stylus Color 440

## **Reagentes**

### **Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (TP0300 and L3540)**

Constituintes do Kit:

Reagente Lowry (code L3540)

Desoxicolato de sódio 0,15% (code D8566)

Ácido tricloroacético a 72% (code T2574)

Reagente Folin & Ciocalteu's phenol (code F9252)

Padrão de proteína (code P5619)

## **Material**

Pipeta de Gilson

Microtubos de centrifugação

Tubos de ensaio

## 7.4. Quantificação do retinol e palmitato de retinil por HPLC

### Equipamentos

Sistema de HPLC:

Injector “Rheodine®, modelo 7125” com sensor de injeção “Rheodine®”, referencia 7161, equipado com loop “Rheodine®” de 20µl

Bomba de alta pressão “Gilson®, modelo 307”

Detector “Gilson®, UV/Vis 151” de comprimento de onda variável

Coluna “Waters®– Spherisorb ODS2”

Pré filtro “Rheodine®”

Programa “Gilson®, Unipoint™, v1.9, System Software”

Computador com sistema operativo “Microsoft, Windows 95” ligado a um monitor de 17” e impressora “Epson® Stylus Color 440”

### Outros equipamentos:

Homogeneizador rotativo de lâminas de alta rotação, accionado por sistema de velocidade regulável “Ystral T1500

Centrifuga refrigerada “Beckman®, J-21B”, com rotor “J20”

Vortéx Unimag ZX

Balanças “Mettler®, H54, e “Kern®, EG300-3M

Destilador “GFL® modelo 2001/4”

Pipeta de Gilman

Argon comprimido (99,995% de pureza) - Praxair®

### Reagentes

Butil-hidroxitolueno - Sigma®

Cloreto de potássio - Analar®

Clorofórmio (para HPLC) - Panreac®

Metanol (para HPLC) - Merck®

Acetato de retinilo – R4632 Sigma®

Palmitato de retinil - R3375 Sigma®

Retinol – R7632 Sigma®

### Preparação de soluções

#### Solução de padrão interno enriquecido

(2,5 µg/ml de acetato de retinilo de padrão interno enriquecido com 1µg/ml de retinol e 4,5 µg/ml de palmitato de retinilo)

Em 50 ml de metanol, adicionar 500 µg de retinol, 750 µg de palmitato de retinilo e 1250 µg de acetato de retinilo.

**Cloreto de potássio** (0,37% p/v): Em 25 ml de água destilada adicionar 92,5 mg de cloreto de potássio.

### **Solução de clorofórmio/metanol (1:1)**

### **Solução de clorofórmio/metanol (2:1) com 50 µg/ml butil-hidroxitolueno**

Juntar 60 ml de clorofórmio e 30 ml de metanol e adicionar 4,5 mg de butil-hidroxitolueno

### **Soluções de calibração**

0,2µg/ml de retinol; 0,6µg/ml palmitato de retinil; 1µg/ml acetato de retinilo

1µg/ml de retinol; 3µg/ml palmitato de retinil; 1µg/ml acetato de retinilo

4µg/ml de retinol; 12µg/ml palmitato de retinil; 1µg/ml acetato de retinilo

### **Outros materiais utilizados em diversos procedimentos:**

Pontas de Gilson

Tubos de ensaio

Pipetas de plásticos

## 7.5. Técnica de imunocitoquímica

### 7.5.1. Receptor ER alfa

#### Equipamentos

Estufa a 60°C “Heraeus” RB350  
Destilador “GFL® modelo 2001/4”  
Medidor de pH “Beckman® Φ320”  
Balanças “Kern®, EG300-3M”

#### Reagentes

Ácido clorídrico – Merck®	Ácido cítrico - Merck®
Cloreto de Sódio – Merck®	Etanol – AGA
Hidróxido de Sódio – Merck®	Tris – Sigma
Xilol – J. T. Baker	

**Anticorpo receptor estrogénios alfa (clone SP1) (anticorpo monoclonal de coelho) – LabVision #RM-9101-Thermo Scientific:** Diluição do anticorpo em TBS de 1/100

**Kit Ultra vision detection system anti-polyvalent, HRP/DAB – LabVision #TP-015-HD-Thermo Scientific**

Constituído por:

peróxido de hidrogénio;  
ultra block, biotinylated goat anti-polivalent;  
streptavidin peroxidase;  
DAB substrate e DAB plus chromogen

#### Preparação das soluções

##### Tampão citrato (10 mM a pH 6)

Preparar uma solução de citrato dissódico 0,1M (2,1g de ácido cítrico em 100ml de água destilada) e uma solução de hidróxido de sódio 0,1N (0,4g de hidróxido de sódio em 100ml de água destilada). Para a solução tampão final de 200ml, juntar 119ml da solução de citrato e 81ml da solução de hidróxido de sódio.

##### Tampão TBS (a pH 7,4)

Em 1 litro de água destilada dissolver 8,1g de cloreto de sódio e 0,6g de Tris. Por fim adicionar 3,8 ml de ácido clorídrico

## 7.5.2. Receptor ER beta

### Equipamentos

Estufa a 60°C “Heraeus” RB350  
Destilador “GFL® modelo 2001/4”  
Medidor de pH “Beckman® Φ320”  
Balanças “Kern®, EG300-3M”

### Reagentes

Fosfato dissódico hidratado - Merck®	Ácido cítrico - Merck®
Cloreto de Sódio – Merck®	Etanol – AGA
Hidróxido de Sódio – Merck®	Cloreto de potássio - Merck®
Fosfato de potássio – BDH ®Chemicals	Xilol – J. T. Baker

**Anticorpo receptor estrogénios beta (policlonal de coelho) - LabVision #RB-10658- Thermo Scientific:** Diluição do anticorpo em TBS de 1/10

### **Polymer detection System Labvision #TL-060-HLS - Thermo Scientific**

Constituído por:

ultra V Block;  
value primary antibody enhancer;  
Value HRP polymer;

DAB e peróxido de hidrogénio do Kit HRP/DAB – LabVision #TP-015-HD- Thermo Scientific

### **Preparação das soluções**

#### **Tampão citrato (10 mM a pH 6)**

Preparar uma solução de citrato dissódico 0,1M (2,1g de ácido cítrico em 100ml de água destilada) e uma solução de hidróxido de sódio 0,1N (0,4g de hidróxido de sódio em 100ml de água destilada). Para a solução tampão final de 200ml, juntar 119ml da solução de citrato e 81ml da solução de hidróxido de sódio.

#### **Tampão PBS (a pH 7,4)**

Em 1 litro de água destilada dissolver 8g de cloreto de sódio, 1,44g de fosfato dissódico hidratado, 0,2g de fosfato de potássio e 0,2g de cloreto de potássio.

## Bibliografia

- Aaron B.B. and Gosline J.M. - Optical properties of single elastin fibres indicate random protein conformation. *Nature*, 287, (1980), 865-867.
- Abler L.L., Mansour S.L. and Sun X. - Conditional gene inactivation reveals roles for Fgf10 and Fgfr2 in establishing a normal pattern of epithelial branching in the mouse lung. *Development Dynamics*, 238, (2009), 1999-2013.
- Adamson I.Y. and Bowden D.H. - Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. *Laboratory Investigation*, 32, (1975), 736-745.
- Adler K.B., Low R.B., Leslie K.O., Mitchell J. and Evans J.N. - Biology of disease. Contractile cells in normal and fibrotic lung. *Laboratory Investigation*, 60, (1989), 473-485.
- Albertine K.H. and Physher T.J. - Pulmonary consequences of preterm birth. **In:** *The lung development, aging and the environment*, cap. 16, pp. 237-251, Ed. Harding R., Pinkerton K.E. and Plopper C.G., Elsevier Academic Press, (2004).
- Alles A.J. and Sulik K.K. - Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanisms. *Teratology*, 40, (1989), 163-171.
- Argaves W.S., Tran H., Burgess W.H. and Dickerson K. - Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *The Journal of Cell Biology*, 111, (1990), 3155-3164.
- Arman E., Haffner-Krausz R., Gorivodsky M. and Lonai P. - Fgfr2 is required for limb outgrowth and lung-branching morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96, (1999), 11895-11899.
- Attar M.A., Bailie M.B., Christensen P.J., Brock T.G., Wilcoxon S.E. and Paine R. - Induction of ICAM-1 expression on alveolar epithelial cells during lung development in rats and humans. *Experimental Lung Research*, 25, (1999), 245-259.
- Bairos V.A. - Estudos sobre a morfogênese, histogênese e histofisiologia do pulmão. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, (1986).
- Balmer J.E. and Blomhoff R. - Gene expression regulation by retinoic acid. *Journal of Lipid Research*, 43, (2002), 1773-1808.
- Bashir M., Indik Z., Yeh H., Abrams W., Ornstein-Goldstein N., Rosenbloom J.C., Fazio M., Uitto J., Mecham R. and Rosenbloom J. - Elastin gene structure and mRNA alternative splicing. **In:** *Elastin chemical and biological aspects*, pp. 45-70, Ed. Tamburro A.M. and Davidson J.M., Galatina Congedo Editore, (1990).
- Bashir M.M., Abrams W.R., Rosenbloom J. Kucich U., Bacarra M., Han M., Brown-Augsberger P., Mecham R. and Rosenbloom J. - Microfibril-associated glycoprotein: characterization of the bovine gene and of the recombinantly expressed protein. *Biochemistry*, 33, (1994), 593-600.
- Bellusci S., Henderson R., Winnier G., Oikawa T. and Hogan B. L. M. - Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein-4 (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development*, 122, (1996), 1693-1702.
- Bellusci S., Furuta Y., Rush M.G., Henderson R., Winnier G. and Hogan B.M.L. - Involvement of sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*, 124, (1997a), 53-63.

Bellusci S., Grindley J., Emoto H., Itoh N. and Hogan B.L.M. - Fibroblasts growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development*, 124, (1997b), 4867-4878.

Berk J.L., Hatch C.A., Morris S.M., Stone P.J. and Goldstein R.H. - Hypoxia suppresses elastin repair by rat lung fibroblasts. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 289, (2005), L931-936.

Bhatt A.J., Pryhuber G.S., Huyck H., Watkins R.H., Metlay L.A. and Maniscalco W.M. - Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, (2001), 1971-1980.

Biesalski H.K. and Nohr D. - Importance of vitamin-A for lung function and development. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, (2003), 431-440.

Blanco L.N., Massaro D. and Massaro G.D. - Alveolar size, number, and surface area: developmentally dependent response to 13% O<sub>2</sub>. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology* 261, (1991), L370-377.

Blomhoff R., Helgerud P., Rasmussen M., Berg T. and Norum K.R. - In vivo uptake of chylomicron [<sup>3</sup>H] retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 79, (1982), 7326-7330.

Blomhoff R., Green M.H., Berg T. and Norum K.R. - Transport and storage of vitamin A. *Science*, 250, (1990), 399-404.

Boggaram V. - Thyroid transcription factor-I (TTF-I/NKx2.1/TITFI) gene regulation in the lung. *Clinical Science*, 116, (2009), 27-35.

Bolt R.J., Van Weissenbruch M.M., Lafeber H.N. and Delemarre-Van de Waal H.A. - Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatric Pulmonology*, 32, (2001), 76-91.

Borok Z., Danto S.I., Lubman R.L., Cao Y., Williams M. C. and Crandall E.D. - Modulation of T1 $\alpha$  expression with alveolar epithelial cell phenotype in vitro. *American Journal of Physiology* 275 (Lung Cell Molecular Physiology 19), (1998), L155-164.

Bostrom H., Willetts K., Pekny M., Levéen P., Lindahl P., Hedstrand H., Pekna M., Hellstrom M., Gebre-Medhin S., Schalling M., Nilsson M., Kurland S., Tornell J., Heath J.K. and Betsholtz C. - PDGF-A signalling is a critical event in lung alveolar myofibroblasts development and alveogenesis. *Cell*, 85, (1996), 863-873.

Bostrom H., Gritli-Linde A. And Betsholtz C. - PDGF-A/PDGF alpha-receptor signaling is required for lung growth and the formation of alveoli but not for early lung branching morphogenesis. *Development Dynamics*, 223, (2002), 155-162.

Brandenberger, AW., Tee MK., Lee JY., Chao V. and Jaffe RB. - Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER- $\alpha$ ) and beta (ER- $\beta$ ) mRNA in the midgestational human fetus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82, (1997), 3509-3512.

Bressan G.M., Daga-Gordini D., Colombatti A., Castellani I., Marigo V. and Volpin D. - Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *The Journal of Cell Biology*, 121, (1993), 201-212.

Brody J.S. and Kaplan N.B. - Proliferation of alveolar interstitial cells during postnatal lung growth. Evidence for two distinct populations of pulmonary fibroblasts. *The American Review of Respiratory Disease*, 127, (1983), 763-770.

Broustail M. - Reproduction: son aspect biologique. Reproduction: son aspect génétique. **In** *La souris de laboratoire et son élevage*, pp. 13-27, Ed. Vigot Frères, Paris, 3<sup>e</sup>Ed., (1967).

Brown K.R.S., England K.M., Goss K.L., Snyder J.M. and Acarregui M.J. - VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 281, (2001), L1001-1010.

Bruce M.C. and Lo P. - A morphometric quantitation of development changes in elastic fibers in rat lung parenchyma: variability with lung region and postnatal age. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 117, (1991), 226-233.

Bruce M.C., Honaker C.E. and Cross R.J. - Lung fibroblasts undergo apoptosis following alveolarization. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 20, (1999), 228-236.

Cai K.Q., Capo-Chichi C.D., Rula M.E., Yang D. and Xu X. - Dynamic GATA 6 expression in primitive endoderm formation and maturation in early mouse embryogenesis. *Development Dynamics*, 237, (2008), 2820-2829.

Cardoso, W.V., Itoh A., Nogawa H., Mason I. and Brody J.S. - FGF-1 and FGF-7 induce distinct patterns of growth and differentiation in embryonic lung epithelium. *Development Dynamics*, 208, (1997), 398-405.

Cardoso W.V. - Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas. *Development Dynamics*, 219, (2000), 121-130.

Cardoso W.V. - Molecular regulation of lung development. *Annual Review of Physiology*, 63, (2001), 471-494.

Cardoso W.V. - Lung morphogenesis, role of growth factors and transcription factors. **In**: *The lung development, aging and the environment*, cap. 1, pp. 3- 11, Ed. Harding R., Pinkerton K.E. and Plopper C.G., Elsevier Academic Press., (2004).

Cardoso W.V. and Lu J. - Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development*, 133, (2006), 1611-1624.

Carey M.A., Card J.W., Voltz J.W., Arbes Jr S.J., Germolec D.R., Korach K.S. and Zeldin D.C. - It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18, (2007), 308-313.

Chambon P. - A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb Journal*, 10, (1996), 940-954.

Chazaud C., Chambon P. and Dollé P. - Retinoic acid is required in the mouse embryo for left-right asymmetry determination and heart morphogenesis. *Development*, 126, (1999), 2589-2596.

Chen H., Jackson S., Doro M. and McGowan S. - Perinatal expression of genes that may participate in lipid metabolism by lipid-laden lung fibroblasts. *Journal of Lipid Research*, 39, (1998a), 2483-2492.

Chen J., Knowles H.J., Hebert J.L. and Hackett B.P. - Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *Journal of Clinical Investigation*, 102, (1998b), 1077-1082.

Chen F., Desai T., Qian J., Niederreither K., Lu J. And Cardoso W.C. - Inhibition of Tgf $\beta$  signaling by endogenous retinoic acid is essential for primary lung bud induction. *Development*, 134, (2007), 2969-2979.

Cheng G, Weihua Z., Makinen S., Makela S., Saji S., Warner M., Gustafsson JA. and Hovatta O. - A role for the androgen receptor in follicular atresia of receptor beta knockout mouse ovary. *Biology of Reproduction* 66, (2002), 77-84.

Chi E.Y. - The ultrastructural study of glycogen and lamellar bodies in the development of fetal monkey lung. *Experimental Lung Research*, 8, (1985), 275-289.

Chung K.F. - Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 18, Suppl.34, (2001), 50s-59s.

Chytil F. - The lungs and vitamin A. *American Journal of Physiology*, 262 (Lung Cell Molecular Physiology, 6), (1992), L517-L527.

Chytil F. - Retinoids in lung development. *Faseb Journal*, 10, (1996), 986-992.

Clark R.H., Gerstmann D.R., Jobe A.H., Moffitt S.T., Slutsky A.S. and Yoder B.A. - Lung injury in neonates: causes, strategies for prevention, and long-term consequences. *The Journal of Pediatrics*, 139, (2001), 478-486.

Cole T.J., Blendy J.A., Monaghan A.P., Krieglstein K., Schmid W., Aguzzi A., Fantuzzi G., Hummler E., Unsicker K. and Schutz G. - Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & Development*, 9, (1995), 1608-1621.

Costa R.H., kalinichenko V.V. and Lim L. - Transcription factors in mouse lung development and function. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 280, (2001), L823-L838.

Couse, JF., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson JA. and Korach KS. - Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-a (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor-b (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology*, 138, (1997), 4613-4621.

Cox B.A., Starcher B.C. and Urry D.W. - Coacervation of  $\alpha$ -elastin results in fiber formation. *Biochimica et Biophysica acta*, 317, (1973), 209-213.

Cox B.A., Starcher B.C. and Urry D.W. - Coacervation of tropoelastin results in fiber formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, (1974), 997-998.

Coxson H.O., Chan I.H.T., Mayo J.R., Hlynsky J., Nakano Y. and Birmingham C.L. - Early emphysema in patients with anorexia nervosa. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170, (2004), 748-752.

Crouch E. and Wright J.R. - Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annual Review of Physiology*, 63, (2001), 521-554.

Daamen W.F., Hafmans T., Veerkamp J.H. and van Kuppevelt T.H. - Comparison of five procedures for the purifications of insoluble elastin. *Biomaterials*, 22, (2001), 1997-2005.

Davis E.C. and Mecham R.P. - Selective degradation of accumulated secretory proteins in the endoplasmic reticulum. A possible clearance pathway for abnormal tropoelastin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, (1996), 3787-3794.

- Davis E.C. and Mecham R.P. - Intracellular trafficking of tropoelastin. *Matrix Biology*, 17, (1998a), 245-254.
- Davis E.C., Broekelmann T.J., Ozawa Y. and Mecham R.P. - Identification of tropoelastin as a ligand for the 65-KD FK506-binding protein, FKBP65, in the secretory pathway. *The Journal of Cell Biology*, 140, (1998b), 295-303.
- De Luca L.M. - Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb Journal*, 5, (1991), 2924-2933.
- De Maximy A.A., Nakatake Y., Moncada S., Itoh N., Thierry J.P. and Bellusci S. - Cloning and expression pattern of a mouse homologue of *Drosophila sprouty* in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*, 81, (1999), 213-216.
- Debelle L. and Tamburro A.M. - Elastin: molecular description and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31, (1999), 261-272.
- Desai T.J., Malpel S., Flentke G.R., Smith S.M. and Cardoso W.V. - Retinoic acid selectively regulates Fgf10 expression and maintains cell identity in the prospective lung field of the developing foregut. *Developmental Biology*, 273, (2004), 402-415.
- Desai T.J., Chen F., Lu J., Qian J., Niederreither K., Dollé P., Chambon P. and Cardoso W.V. - Distinct roles for retinoic acid receptors alpha and beta in early lung morphogenesis. *Developmental Biology*, 129, (2006), 12-24.
- Dickman E.D., Thaller C. and Smith S.M. - Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development*, 124, (1997), 3111-3121.
- Doi M., Nagano A. and Nakamura Y. - Molecular cloning and characterization of a novel gene, EMILIN-5, and its possible involvement in skeletal development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, (2004), 888-893.
- Doi T., Sugimoto K. and Puri P. - Prenatal retinoic acid up-regulates pulmonary gene expression of COUP-TF II, FOG2, and GATA4 in pulmonary hypoplasia. *Journal of Pediatric surgery*, 44, (2009), 1933-1937.
- Doliana R., Mongiat M., Bucciotti F., Giacomello E., Deutzmann R., Volpin D., Bressan G.M. and Colombatti A. - EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/Tumor necrosis factor superfamily of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, (1999), 16773-16781.
- Doliana R., Bot S., Mungiguerra G., Canton A., Cilli S.P. and Colombatti A. - Isolation and characterization of EMILIN-2, a new component of the growing EMILINs family and a member of the EMI domain-containing superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, (2001), 12003-12011.
- Dollé P., Ruberte E., Leroy P., Morriss-Kay G. and Chambon P. - Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development*, 110, (1990), 1133-1151.
- Dollé P. - Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nuclear Receptor Signaling*, 12, (2009), 7:e006
- Duester G. - Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry*, 35, (1996), 12221-12227.

Duester G. - Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *European Journal of Biochemistry*, 267, (2000), 4315-4324.

Dumont D.J., Fong G., Puri M.C., Gradwohl G., Alitalo K. and Breitman M.L. - Vascularization of the mouse embryo: a study of *flk-1*, *tek*, *tie*, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Development Dynamics*, 203, (1995), 80-92.

Fanning J.C. and Cleary E.G. - Identification of glycoproteins associated with elastin-associated microfibrils. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33, (1985), 287-294.

Fawcett D., Pasceri P., Fraser R., Colbert M., Rossant J. and Giguère V. - Postaxial polydactyly in forelimbs of CRABP-II mutant mice. *Development*, 121, (1995), 671-679.

Finnis M.L. and Gibson, M.A. - Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) binds to the pepsin-resistant domain of the  $\alpha 3$  (VI) chain of type VI collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, (1997), 22817-22823.

Fitch S.M., Harkness M.L.R. and Harkness R.D. - Extraction of collagen from tissues. *Nature*, 176, (1955), 163.

Foster J.A., Rubin L., Kagan H.M. and Franzblau C. - Isolation and characterization of cross-linked peptides from elastin. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, (1974), 6191-6196.

Fraslon C. and Bourbon J.R. - Retinoids control surfactant phospholip biosynthesis in fetal rat lung. *American Journal of Physiology*, 266, (1994), L705-712.

Frerking I., Gunther A., Seeger W. and Pison U. - Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Medicine*, 27, (2001), 1699-1717.

Geevarghese S.K. and Chytil F. - Depletion of retinyl esters in the lungs coincides with lung prenatal morphological maturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 200, (1994), 529-535.

George E.L., Georges-Labouesset E.N., Patel-King R.S., Rayburn H. and Hynes R.O. - Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 119, (1993), 1079-1091.

George T.N. and Snyder J.M. - Regulation of surfactant protein gene expression by retinoic acid metabolites. *Pediatric Research*, 41, (1997), 692-701.

Gibson M.A., Hatzinikolas G., Kumaratilake J.S., Sandberg L.B., Nicholl J.K., Sutherland G.R. and Cleary E.G. - Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MP25). *The Journal of Biological Chemistry*, 271, (1996), 1096-1103.

Gibson M.A., Kumaratilake J.S. and Cleary E.G. - The protein components of the 12-nanometer microfibrils of elastic and nonelastic tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, (1989), 4590-4598.

Giguere V., Lyn S., Yip P., Siu C. and Amin S. - Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87, (1990), 6233-6237.

Giguere V., Ong E.S., Segui P. and Evans R.M. - Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, 330, (1987), 624-629.

- Gilbert, Scott F.- *Developmental Biology*, pp. 515, Sinauer Associates Inc., 7<sup>a</sup> ed., (2003)
- Gonçalves C.A. - O sistema elástico e a sua modulação pela vitamina A. Alguns aspectos morfológicos e bioquímicos. Tese de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, (1998).
- Gonçalves C., Barros J., Honório A., Rodrigues P. and Bairos V. - Quantification of elastin from the mouse lung during postnatal development. *Experimental Lung Research*, 27, (2001), 533-545.
- Goodman D.S. - Vitamin A and retinoids in health and disease. *The New England Journal of Medicine*, 310, (1984), 1023-1031.
- Gould V.E., Tosco R., Wheelis R.F., Gould N.S. and Kapanzi Y. - Oxygen pneumonitis in man. Ultrastructural observations on the development of alveolar lesions. *Laboratory Investigation*, 26, (1972), 499-508.
- Grant M.M., Cutts N.R. and Brody J.S. - Alterations in lung basement during fetal growth and type II cell development. *Developmental Biology*, 97, (1983), 173-183.
- Green M.C., Sweet H.O. and Bunker L.E. - Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *American Journal of Pathology*, 82, (1976), 493-512.
- Green, S., Walter P., Greene G., Krust A., Goffin C., Jensen C., Scrase G., Waterfield M. and Chambon P. - Cloning of the oestrogen receptor cDNA. *Journal Steroid Biochemistry*, 24, (1986), 77-83.
- Grosso L.E. and Scott M. - Peptide sequences selected by BA4, a tropoelastin-specific monoclonal antibody, are ligands for the 67-Kilodalton bovine elastin receptor. *Biochemistry*, 32, (1993), 13369-13374.
- Guida E., Codini M., Palmerini C.A., Fini C., Lucarelli C. and Floridi A. - Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of desmosines in tissues. *Journal Chromatography*, 507, (1990), 51-57.
- Guo L., Degenstein L. and Fuchs E. - Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes & Development*, 10, (1996), 165-175.
- Hackett B.P., Brody S.L., Liang M., Zeitz I.D., Bruns L.A. and Gitlin J.D. - Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92, (1995), 4249-4253.
- Handford P. - Fibrillin-1, a calcium binding protein of extracellular matrix. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1498, (2000), 84-90.
- Hamada H., Meno C., Watanabe D. and Saijoh Y. - Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nature reviews Genetics*, 3, (2002), 103-113.
- Harding R., Cock M.L. and Albuquerque C.A. - Role of nutrition in lung development before and after birth. **In:** *The lung development, aging and the environment*, cap. 17, pp. 253-266, Ed. Harding R., Pinkerton K.E. and Plopper C.G., Elsevier Academic Press, (2004).
- Hawgood S., Ochs M., Jung A., Akiyama J., Allen L., Brown C., Edmondson J., Levitt S., Carlson E., Gillespie A.M., Villar A., Epstein C. and Poulain F.R. - Sequential targeted deficiency of SP-A

- and -D leads to a progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 283, (2002), L1002-1010.
- Hilfer S.R - Morphogenesis of the lung: control of embryonic and fetal branching. *Annual Review of Physiology*, 58, (1996), 93-113.
- Hind M. and Maden M. - Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung. *European Respiratory Journal*, 23, (2004), 20-27.
- Hinek A., Wrenn D.S., Mecham R.P. and Barondes S.H. - The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science*, 239, (1988), 1539-1541.
- Hinek A., Rabinovitch M, Keeley F., Okamura-Oho Y. and Callahan J. - The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Clinical Investigation*, 91, (1993), 1198-1205.
- Hinek A. and Rabinovitch M. - 67-KD Elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *The Journal of Cell Biology*, 126, (1994), 563-574.
- Hinek A., Keeley F.W. and Callahan J. - Recycling of the 67-KDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin. *Experimental Cell Research*, 220, (1995), 312-324.
- Hirai M., Ohbayashi T., Horiguchi M., Okawa K., Hagiwara A., Chien K.R., Kita T. and Nakamura T. - Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 176, (2007), 1061-1071.
- Hofhuis W., Jongste J.C. and Merkus P.J.F.M. - Adverse health effects of prenatal and postnatal tobacco smoke exposure on children. *Archives of Disease in Childhood*, 88, (2003), 1086-1090.
- Honório A.M. - Quantificação da elastina ao longo do desenvolvimento do pulmão das aves. Aferição de metodologias para determinação da elastina. Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, (2007).
- Husain A.N., Siddiqui N.H. and Stocker J.T. - Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Human Pathology*, 29, (1998), 710-717.
- Inder T.E., Graham P.J., Winterbourn C.C., Austin N.C. and Darlow B.A. - Plasma vitamin A levels in the very low birthweight infant- relationship to respiratory outcome. *Early Human Development*, 52, (1998), 155-168.
- Iozzo R.V. and Murdoch A.D. - Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *The FASEB Journal*, 10, (1996), 598-614.
- Ito T., Kagoshima M., Sasaki Y., Li C., Udaka N., Kitsukawa T., Fujisawa H., Taniguchi M., Yagi T., Kitamura H. and Goshima Y. - Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mechanisms of Development*, 97, (2000), 35-45.
- Jakkula M., Le Cras T.D., Gebb S., Hirth K.P., Tuder R.M., Voelkel N.F. and Abman S.H. (2000) Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 279, L600-607.
- Jensen S.A., Vrhovski B. and Weiss A.S. - Domain 26 of tropoelastin plays a dominant role in association by coacervation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, nº 37, (2000), 28449-28454.

Jobe A.H. and Ikegami M. - Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era. *Annual Review of Physiology*, 62, (2000), 825-846.

Jobe A.H. and Ikegami M. - Antenatal infection/inflammation and postnatal lung maturation and injury. *Respiratory Research*, 2, (2001), 27-32.

Joshi S. and Kotecha S. - Lung growth and development. *Early Human Development*, 83, (2007), 789-794.

Kagoshima M., Ito T., Kitamura H. and Goshima Y. - Diverse gene expression and function of semaphorins in developing lung: positive and negative regulatory roles of semaphorins in lung branching morphogenesis. *Genes to Cells*, 6, (2001), 559-571.

Karlinsky J.B., Goldstein R.H., Ojserkis B. and Snider G.L. - Lung mechanics and connective tissue levels in starvation-induced emphysema in hamsters. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 251, (1986), R282-288.

Kasahara Y., Tuder R.M., Taraseviciene-Stewart L., Le Cras T.D., Abman S., Hirth P.K., Waltenberger J. and Voelkel N.F. - Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *Journal of Clinical Investigation*, 106, (2000), 1311-1319.

Kastner, P., Mark M., Ghyselinck N., Krezel W., Dupé V., Grondona J. M. and Chambon P. - Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development, *Development*, 124, (1997), 313-326.

Kawai, H., Ishii A., Washiya K., Konno T., Yamaya C., Ono I., Minamiya Y. and Ogawa J. - Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  are prognostics factors in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 11, (2005), 5084-5089.

Keijzer R., vanTuyl M., Meijers C., Post M., Tibboel D., Grosveld F. and Koutsourakis M. - The transcription factor GATA6 is essential for branching morphogenesis and epithelial cell differentiation during fetal pulmonary development. *Development*, 128, (2001), 503-511.

Kennedy K.A., Stoll B.J., Ehrenkranz R.A., Oh W., Wright L.L., Stevenson D.K., Lemons J.A., Sowell A., Mele L., Tyson J.E. and Verter J. - Vitamin A to prevent bronchopulmonary dysplasia in very-low-birth-weight infants: has the dose been too low? *Early Human Development*, 49, (1997), 19-31.

Keyzer R. and Post M. - Lung branching morphogenesis: role of growth factors and extracellular matrix. **In:** *Lung Development*, pp. 1-16, Ed. Gaultier C, Bourbon J.R. and Post M., Oxford University Press, (1999).

Khoor A., Stahlman M.T., Gray M.E. and Whitsett J.A. - Temporal-spatial distribution of SP-B and SP-C proteins and mRNAs in developing respiratory epithelium of human lung. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 42, (1994), 1187-1199.

Kielty C.M., Raghunath M., Siracusa L.D., Sherratt M.J. Peters R., Shuttleworth C.A. and Jimenez S.A. - The tight skin mouse: demonstration of mutant fibrillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. *The Journal of Cell Biology*, 140, (1998), 1159-1166.

Kimura S., Hara Y., Pineau T., Fernandez-Salguero P., Fox C.H., Ward J.M. and Gonzalez F.J. - The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes & Development*, 10, (1996), 60-69.

Knapczyk K., Duda M., Szafranska B., Wolsza K., Panasiewicz G., Kozirowski M. and Slomczynska M. - Immunolocalisation of oestrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) in porcine embryos and fetuses at different stages of gestation. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56, (2008), 221-233.

Kochhar D.M. - Limb development in mouse embryos. I. Analysis of teratogenic effects of retinoic acid. *Teratology*, 7, (1973), 289-295.

Koehler, KF., Helguero LA., Haldosen LA., Warner M. and Gustafsson JA. - Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrine Reviews*, 26, (2005), 465-478.

Kostka G., Giltay R., Bloch W., Addicks K., Timpl R., Fassler R. and Chu M. - Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*, 21, (2001), 7025-7034.

Kreda S.M., Gynn M.C., Fenstermacher D.A., Boucher R.C. and Gabriel S.E. - Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 24, (2001), 224-234.

Kubota Y., Kleinman H.K., Martin G.R. and Lawley T.J. - Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *The Journal of Cell Biology*, 107, (1988), 1589-1598.

Kuiper GG., Carlsson B., Grandien K., Enmark E, Häggblad J., Nilsson S. and Gustafsson J. - Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, 138, (1997), 863-870.

Kullander K. and Klein R. - Mechanisms and functions of eph and ephrin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, (2002), 475-486.

Kumar V.H., Lakshminrusimha S., El Abiad M.T., Chess P.R. and Ryan R.M. - Growth factors in lung development. *Advances in Clinical Chemistry*, 40, (2005), 261-316.

Kunig A.M., Balasubramaniam V., Markham N.E., Morgan D., Montgomery G., Grover T.R. and Abman S.H. - Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 289, (2005), L529-535.

Lampron C., Rochette-Egly C., Gorry P., Dollé P., Mark M., Lufkin T., LeMeur M. and Chambon P. - Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABP II) or both CRABP I and CRABP II are essentially normal. *Development*, 121, (1995), 539-548.

Lawson K.A., Dunn N.R., Roelen B.A.J., Zeinstra L.M., Davis A.M., Wright C.V.E., Korving J.P.W.F.M. and Hogan B.L.M. - Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Development*, 13, (1999), 424-436.

Lawson P.R. and Reid K.B.M. - The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunological Reviews*, 173, (2000), 66-78.

Le Cras T.D., Markham N.E., Tuder R.M., Voelkel N.F. and Abman S.H. - Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 283, (2002), L555-L562.

Lent R.W., Smith B., Salcedo L.L., Faris B. and Franzblau C. - Studies on the reduction of elastin. II. Evidence for the presence of  $\alpha$ -amino adipic acid  $\delta$ -semialdehyde and its aldol condensation product. *Biochemistry*, 8, (1969), 2837-2845.

Liggins G.C. and Howie R.N. - A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*, 50, (1972), 515-525.

Lindahl P., Karlsson L., Hellstrom M., Gebre-Medhin S., Willetts K., Heath J.K. and Betsholtz C. - Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development*, 124, (1997), 3943-3953.

Litingtung Y., Lei L., Westphal H. and Chiang C. - Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nature Genetics*, 20, (1998), 58-61.

Loughna S. and Sato T.N. - Angiopoietin and Tie signalling pathways in vascular development. *Matrix Biology*, 20, (2001), 319-325.

Lowe L.A., Yamada S. and Kuehn M.R. - Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development*, 128, (2001), 1831-1843.

Lubahn, DB., Moyer JM., Golding TS., Couse JF., Korach KS. and Smithies O. - Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, (1993), 11162-11166.

Lui R., Harvey C.S. and McGowan S.E. - Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures. *American Journal Physiology*, 265, (1993), L430-437.

Lyon A. - Chronic lung disease of prematurity. The role of intra-uterine infection. *European Journal of Pediatrics*, 159, (2000), 798-802.

Mactier H. and Weaver L.T. - Vitamin A and preterm infants: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Archives of Disease in Childhood Fetal Neonatal*, 90, (2005), F103-108.

Maden M. - Retinoids have differing efficacies on alveolar regeneration in dexamethasone-treated mouse. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 35, (2006), 260-267.

Mader S., Chen J.Y., Chen Z., White J., Chambon P. and Gronemeyer H. - The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *The EMBO Journal*, 12, (1993), 5029-5041.

Maeda Y., Davé V. and Whitsett J.A. - Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiological Reviews*, 87, (2007), 219-244.

Maksvytis, H.J., Vaccaro C. and Brodt J.S. - Isolation and characterization of the lipid-containing interstitial cell from the developing rat lung. *Laboratory Investigation*, 45, (1981), 248-259.

Malpel S., Mendelsohn C. and Cardoso W.V. - Regulation of retinoic acid signalling during lung morphogenesis. *Development*, 127, (2000), 3057-3067.

Mangelsdorf D.J., Ong E.S., Dyck J.A. and Evans R.M. - Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*, 345, (1990), 224-229.

Maniscalco W.M., Watkins R.H., D'Angio C.T. and Ryan R.M. - Hyperoxia injury decreases alveolar epithelial cell expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in neonatal rabbit lung. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 16, (1997), 557-567.

- Mariani T.J. and Pierce R.A. - Development of lung elastic matrix. **In:** Lung Development, pp. 28-45, Ed. Gaultier C, Bourbon J.R. and Post M., Oxford University Press, (1999).
- Mariani T.J., Sandefur S. and Pierce R.A. - Elastin in lung development. *Experimental Lung Research*, 23, (1997), 131-145.
- Maritz G.S., Cock M.L., Louey S., Joyce B.J., Albuquerque C.A. and Harding R. - Effects of fetal growth restriction on lung development before and after birth: a morphometric analysis. *Pediatric Pulmonology*, 32, (2001), 201-210.
- Maritz G.S. - Maternal nicotine exposure during gestation and lactation of rats induce microscopic emphysema in the offspring. *Experimental Lung Research*, 28, (2002), 391-403.
- Maritz G.S., Morley C.J. and Harding R. - Early developmental origins of impaired lung structure and function. *Early Human Development*, 81, (2005), 763-771.
- Massaro D., Teich N., Maxwell S., Massaro G.D. and Whitney P. - Postnatal development of alveoli. Regulation and evidence for a critical period in rats. *Journal of Clinical Investigation*, 76, (1985), 1297-1305.
- Massaro D. and Massaro G.D. - Dexamethasone accelerates postnatal alveolar wall thinning and alters wall composition. *American Journal of Physiology* 251 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 20), (1986), R218-224.
- Massaro G.D., Mortola J.P. and Massaro D. - Sexual dimorphism in the architecture of lung's gas-exchange region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92, (1995), 1105-1107.
- Massaro G.D. and Massaro D. - Formation of pulmonary alveoli and gas-exchange surface area: quantification and regulation. *Annual Review*, 58, (1996a), 73-92.
- Massaro G.D. and Massaro D. - Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *American Journal of Physiology* 270 (Lung Cell Molecular Physiology 14), (1996b), L305-L310.
- Massaro G.D., Mortola J.P. and Massaro D. - Estrogen modulates the dimensions of the lung's gas-exchange surface area and alveoli in female rats. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 270, (1996c), L110-L114.
- Massaro G.D. and Massaro D. - Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and in mice. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 278, (2000a), L955-L960.
- Massaro G.D., Massaro D. Chan W., Clerch L.B., Ghyselinck N., Chambon P. and Chandraratna R.A.S. - Retinoic acid receptor- $\beta$ : an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiological Genomics*, 4, (2000b), 51-57.
- Massaro D. and Massaro G.D. - Pre- and postnatal lung development, maturation, and plasticity invited review: Pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen", and others regulators. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology* 282, (2002a), L345-358.
- Massaro G.D., Radaeva S., Clerch L.B. and Massaro D. - Lung alveoli: endogenous programmed destruction and regeneration. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology* 283, (2002b), L305-309.

Massaro D. and Massaro G.D. - Estrogen regulates pulmonary alveolar formation, loss and regeneration in mice. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 278, (2004a), L1154-L1159.

Massaro D., Massaro G.D., Baras A., Hoffman E.P. and Clerch L.B. - Calorie-related rapid onset of alveolar loss, regeneration, and changes in mouse lung gene expression. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology* 286, (2004b), L896-906.

Massaro D. and Massaro G.D. - Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimensions: alveolar sexual dimorphism in mice. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 290, (2006), L866-L870.

Massaro D., Clerch L.B. and Massaro G.D. - Estrogen receptor- $\alpha$  regulates pulmonary alveolar loss and regeneration in female mice: morphometric and gene expression studies. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 293, (2007), L222-L228.

Masters J.R. - Epithelial-mesenchymal interaction during lung development: The effect of mesenchymal mass. *Developmental Biology*, 51, (1976), 98-108.

McGowan S.E. - Influences of endogenous and exogenous TGF- $\beta$  on elastin in rat lung fibroblasts and aortic smooth muscle cells. *American Journal Physiology*, 263 (Lung Cell Molecular Physiology 7), (1992), L257-263.

McGowan S.E., Harvey C.S. and Jackson S.K. - Retinoids, retinoic acid receptors, and cytoplasmic retinoid binding proteins in perinatal rat lung fibroblasts. *American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 269, (1995), L463-472.

McGowan S.E. and Torday J.S. - The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annual Review of Physiology*, 59, (1997a), 43-62.

McGowan S.E., Doro M.M. and Jackson S.K. - Endogenous retinoids increase perinatal elastin gene expression in rat lung fibroblasts and fetal explants. *American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 273, (1997b), L410-416.

McGowan S.E., Jackson S.K., Jenkins-Moore M., Dai H., Chambon P. and Snyder J.M. - Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 23, (2000), 162-167.

McGowan S.E., Doro M.M. and Jackson S.K. - Expression of lipoprotein receptor and a polipoprotein E genes by perinatal rat lipid-laden pulmonary fibroblasts. *Experimental Lung Research*, 27, (2001), 47-63.

McGowan S.E., Holmes A.J. and Smith J. - Retinoic acid reverses the airway hyperresponsiveness but not the parenchyma defect that is associated with vitamin A deficiency. *American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 286, (2004a), L437-444.

McGowan S.E. and Snyder J.M. - Development of alveoli. In: *The lung development, aging and the environment*, cap. 4, pp. 55-73, Ed. Harding R., Pinkerton K.E. and Plopper C.G., Elsevier Academic Press, (2004b).

McGowan S.E. - Retinoids and pulmonary alveolar regeneration: rationale and therapeutic challenges. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 3, (2006), 77-84.

McGrath-Morrow S.A. and Stahl J. - Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 25, (2001), 150-155.

- Mecham R.P., Hinek A., Entwistle R., Wrenn D., Griffin G.L. and Senior R.M. - Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry*, 28, (1989), 3716-3722.
- Mecham R.P., Whitehouse L., Hay M., Hinek A. and Sheetz M. - Ligand affinity of the 67KD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands. *The journal of Cell Biology*, 113, (1991), 187-194.
- Mendelsohn C., Lohnes D., Décimo D., Lufkins T., LeMeur M., Chambon P. and Mark M. - Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*, 120, (1994), 2749-2771.
- Meno C., Ito Y., Saijoh Y., Matsuda Y., Tashiro K., Kuhara S. and Hamada H. - Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes to Cells*, 2, (1997), 513-524.
- Meno C., Shimono A., Saijoh Y., Yashiro K., Mochida K., Ohishi S., Noji S., Kondoh H. and Hamada H. - *Lefty-1* is required for lefty-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell*, 94, (1998), 287-297.
- Metzler M.D. and Snyder J.M. - Retinoic acid differentially regulates expression of surfactant-associated proteins in human fetal lung. *Endocrinology*, 133, (1993), 1990-1998.
- Min H., Danilenko D.M., Scully S.A., Bolou B., Ring B.D., Tarpley J.E., DeRose M. and Simonet W.S. - *Fgf-10* is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* *branchless*. *Genes & Development*, 12, (1998), 3156-3161.
- Minoo P., Hamdan H., Bu D., Warburton D., Stepanik P. and deLemos R. - TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis. *Developmental Biology*, 172, (1995), 694-698.
- Minoo P., Su G., Drum H., Bringas P. and Kimura S. - Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in *NKx2.1* (-/-) mouse embryos. *Developmental Biology*, 209, (1999), 60-71.
- Mollard R., Viville S., Ward S.J., Décimo D., Chambon P. and Dollé P. - Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoforms transcripts in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*, 94, (2000), 223-232.
- Moore K.L. and Persaud T.V.N. - Before we are born. *Essentials of embryology and birth defects*, pp 241-254, W.B- Saunders Company, 5<sup>th</sup>ed., (1998).
- Morani A., Warner M. and Gustafsson J.A. - Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alpha and beta in epithelial tissues. *Journal of Internal Medicine*, 264, (2008), 128-142.
- Morrissey E.E., Tang Z., Sigrist K., Lu M.M., Jiang F., Ip H.S. and Parmacek M.S. - GATA 6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes & Development*, 12, (1998), 3579-3590.
- Motoyama J., Liu J., Mo R., Ding Q., Post M. and Hui C. - Essential function of *Gli2* and *Gli3* in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nature Genetics*, 20, (1998), 54- 57.
- Muglia L.J., Bae D.S., Brown T.T., Vogt S.K., Alvarez J.G., Sunday M.E. and Majzoub J.A. - Proliferation and differentiation defects during lung development in corticotrophin-releasing hormone-deficient mice. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 20, (1999), 181-188.

Nakajoh M., Fukushima T., Suzuki T., Yamaya M., Nakayama K., Sekizawa K. and Sasaki H. - Retinoic acid inhibits elastase-induced injury in human lung epithelial cell lines. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 28, (2003), 296-304.

Nakamura T., Ruiz-Lozano P., Lindner V., Yabe D., Taniwaki M., Furukawa Y., Kobule K., Tashiro K., Lu Z., Andon N., Schaub R., Matsumori A., Sasayama S., Chien K. and Honjo T. - DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, (1999), 22476-22483.

Nakamura T., Ruiz-Lozano P., Ikeda Y., Iwanaga Y., Hinek A., Minamisawa S., Cheng C., Kobuke K., Dalton N., Takada Y., Tashiro K., Ross J., Honjo T. and Chien K. - Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*, 415, (2002), 171-175.

Napoli J.L. - Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *The FASEB Journal*, 10, (1996), 993-1001.

Neas L.M. and Schwartz J - The determinants of pulmonary diffusing capacity in a national sample of U.S. adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 153, (1996), 656-664.

Neufeld G., Cohen T., Shraga N., Lange T., Kessler O. and Herzog Y. - The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovascular*, 12, (2002), 13-19.

Newcomer M.E. and Ong D.E. - Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, (2000), 57-64.

Nguyet M.N. and Senior R.M. - Laminin isoforms and lung development: All isoforms are not equal. *Developmental Biology*, 294, (2006), 271-279.

Niederreither K., Subbarayan V., Dollé P. and Chambon P. - Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics*, 21, (1999), 444-448.

Niederreither K., Fraulob V., Garnier J.M., Chambon P. and Dollé P. - Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mechanisms of Development*, 110, (2002), 165-171.

Nikolajev K., Heinonen K., Hakulinen A. and Lanssimies E. - Effects of intrauterine growth retardation and prematurity on spirometric flow values and lung volumes at school age in twin pairs. *Pediatric Pulmonology*, 25, (1998), 367-370.

Noguchi A., Reddy R., Kursar J.D., Parks W.C. and Mecham R.P. - Smooth muscle isoactin and elastin in fetal bovine lung. *Experimental Lung Research*, 15, (1989), 537-552.

Noy N. - Retinol-binding proteins: mediators of retinoids action. *Biochemical Journal*, 348, (2000), 481-495.

Odom M.J., Snyder J.M., Boggaram V. and Mendelson C.R. - Glucocorticoid regulation of the major surfactant associated protein (SP-A) and its messenger ribonucleic acid and of morphological development of human fetal lung in vitro. *Endocrinology*, 123, (1988), 1712-1720.

Okabe T., Yorifuji H., Yamada E. and Takaku F. - Isolation and characterization of vitamin-A-storing lung cells. *Experimental Cell Research*, 154, (1984), 125-135.

Olin A.I., Morgelin M., Sasaki T., Timpl R., Heinegard D. and Aspberg A. - The proteoglycans aggrecan and versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, (2001), 1253-1261.

Ong D.E. and Chytil F. - Retinoic acid-binding protein in rat tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, (1975), 6113-6117.

Ong D.E. and Chytil F. - Changes in levels of cellular retinol- and retinoic-acid-binding proteins of liver and lung during perinatal development of rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 73, (1976), 3976-3978.

Ong D.E., Crow J.A. and Chytil F. - Radioimmunochemical determination of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding proteins in cytosols of rat tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, (1982), 13385-13389.

Orgeig S. and Daniels C.B. - The roles of cholesterol in pulmonary surfactant: insights from comparative and evolutionary studies. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)*, 129, (2001), 75-89.

Park H.L., Bai C., Platt K.A., Matise M.P., Hui C.C., Nakashima M. and Joyner A.L. - Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signalling in combination with aGli2 mutation. *Development*, 127, (2000), 1593-1605.

Park W.Y., Miranda B., Lebeche D., Hashimoto G. and Cardoso W.V. - FGF-10 is a chemotactic factor for distal epithelial buds during lung development. *Developmental Biology*, 201, (1998), 125-134.

Parks W.C. and Shapiro S.D. - Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respiratory Research*, 2, (2001), 10-19.

Partridge S.M., Elsdon D.F. and Thomas J. - Constitution of the cross-linkages in elastin. *Nature*, 197, (1963), 1297-1298.

Pata O., Atis S., Oz A.U.; Yazici G., Tok E., Pata C., Kiliç F., Çamdeviren H. and Aban M. - The effects of hormone replacement therapy type on pulmonary functions in postmenopausal women. *Maturitas*, 46, (2003), 213-218.

Patrone C., Cassel T. N., Pettersson K., Piao Y., Cheng G., Ciana P., Maggi A., Warner M., Gustafsson J. - Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor  $\beta$ . *Molecular and Cellular Biology*, 23, (2003), 8542-8552.

Patterson C.E., Schaub T., Coleman E.J. and Davis E.C. - Developmental regulation of FKBP65 an ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Molecular Biology of the Cell*, 11, (2000), 3925-3935.

Pelletier G.J., Brody S.L., Liapis H., White R.A. and Hackett B.P. - A human forkhead/winged-helix transcription factor expressed in developing pulmonary and renal epithelium. *American Journal of Physiology* 274 (Lung Cell Molecular Physiology 18), (1998), L351-359.

Pereira F.A., Qiu Y., Tsai M.J. and Tsai S.Y. - The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Development*, 13, (1999), 1037-1049.

Perl A.K.T. and Whitsett J.A. - Molecular mechanisms controlling lung morphogenesis. *Clinical Genetics*, 56, (1999), 14-27.

Petkovich M., Brand N.J., Krust A. and Chambon P. - A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, 330, (1987), 444-450.

Pierce R.A., Mariencheck W.I., Sandefur S., Crouch E.C. and Parks W.C. - Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *American Journal Physiology* 268 (Lung Cell Molecular Physiology 12), (1995), L491-L500.

Pinto M.L., Rodrigues P., Honório A., Gonçalves C. and Bairos V. - Vitamin A and lung development. **In:** Vitamin A: nutrition, side effects and supplements, cap. 1, pp. 1-46, Ed. Scott L.P, Nova Science Publishers Inc, (2010).

Plopper C.G. and Fanucchi M.V. - Development of airway epithelium. **In:** The lung development, aging and the environment, cap. 2, pp. 13-32, Ed. Harding R., Pinkerton K.E. and Plopper C.G., Elsevier Academic Press, (2004).

Potter G.W.H. Chromatographic techniques. **In:** Analyses of biological molecules. An introduction to principles, instrumentation and techniques pp. 123-162, Ed. Chapman & Hall, Londres, (1995).

Privitera S., Prody C.A., Callahan J.W. and Hinek A. - The 67-KDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of  $\beta$ -galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, (1998), 6319-6326.

Quadro L., Blaner W.S., Salchow D.J., Vogel S., Piantedosi R., Gorras P., Freeman S., Cosma M.P., Colantuoni V. and Gottesman M.E. - Impaired retinaç function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *The EMBO Journal*, 18, (1999), 4633-4644.

Rahmathullah L., Tielsch J.M., Thulasiraj R.D., Katz J., Coles C., Devi S., John R., Prakash K., Sadanand A.V., Edwin N. and Kamaraj C. - Impact of supplementing newborn infants with vitamin A on early infant mortality: community based randomised trial in southern India. *BMJ*, 327, (2003), 1-6.

Randel S.H., Mercer R.R. and Young S.L. - Postnatal growth of pulmonary acini and alveoli in normal and oxygen-exposed rats studied by serial section reconstructions. *The American Journal of Anatomy*, 186, (1989), 55-68.

Rankin C.T., Burton T., Lawler A.M. and Lee S. - Regulation of left-right patterning in mice by growth/differentiation factor-1. *Nature Genetics*, 24, (2000), 262-265.

Reinhardt D.P., Sasaki T., Dzamba B.T. Keene D.R. Chu M., Gohring W., Timpl R. and Sakai Y. - Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, (1996), 19489-19495.

Reynolds L.J., McElroy M. and Richards R.J. - Density and substrata are important in lung type II cell transdifferentiation in vitro. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31, (1999), 951-960.

Ringbaek T., Seersholm N. and Viskum K. - Standardised mortality rates in female and males with COPD and asthma. *European Respiratory Journal*, 25, (2005), 891-895.

Robert B., Szigeti M., Derouette J. and Robert L. - Studies on the nature of the "microfibrillar" component of elastic fibers. *European Journal of Biochemistry*, 21, (1971), 507-516.

Rodrigues P. - Desenvolvimento do pulmão do murganho durante o período pré-natal e a sua modulação pela Vitamina A. Tese de Doutoramento apresentada á Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, (2003).

Rodrigues P., Gonçalves C. and Bairos V. - Metabolic pathways and modulating effects of vitamin A. *Current Medicinal Chemical Immunology Endocrine & Metabolic Agents*, 4, (2004), 119-142.

- Rodrigues P., Gonçalves C., Honório A., Barros J. and Bairos V. - Quantification of mouse lung elastin during prenatal development. *The Open Respiratory Medicine Journal*, 2, (2008), 46-51.
- Roman J. - Fibronectin and fibronectin receptors in lung development. *Experimental Lung Research*, 23, (1997), 147-159.
- Rooney S.A., Young S.L. and Mendelson C.R. - Molecular and cellular processing of lung surfactant. *The FASEB Journal*, 8, (1994), 957-967.
- Rosenbloom J., Abrams W.R. and Mecham R. - Extracellular matrix 4: The elastic fiber. *The FASEB Journal*, 7, (1993), 1208-1218.
- Ross A.C. - Mutations in the gene encoding retinol binding protein and retinol deficiency: is there compensation by retinyl esters and retinoic acid? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, (1999), 829-830.
- Ross R. and Bornstein P. - The elastic fiber: I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *Journal Cell Biology*, 40, (1969), 366-381.
- Ross R. - The elastic fiber. A review. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 21, (1973), 199-208.
- Rucker R.B. and Dubick M.A. - Elastin metabolism and chemistry: potential roles in lung development and structure. *Environmental Health Perspectives*, 55, (1984), 179-191.
- Sadler T.W. - *Langman Embriologia médica*, pp 181-187, Editora Guanabara Koogan SA, 9ª Ed., (2005).
- Sahebji H. and Wirman J.A. - Emphysema-like changes in the lungs of starved rats. *American Review respiratory disease*, 124, (1981), 619-624.
- Sakai L.Y., Keene D.R. and Engvall E. - Fibrillin, a new 350KD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *The Journal of Cell Biology*, 103, (1986), 2499-2509.
- Sandberg L.B., Pollman M., Price L., Roos P., Blankenship J., Field F. and Boucek R. - Structural guidelines for an acceptable elastin and tropoelastin: application towards quantitation of elastin accumulation in tissue culture. **In** : *Elastin chemical and biological aspects*, pp. 21-44, Ed. Tamburro A.M. and Davidson J.M., Galatina Congedo Editore, (1990).
- Sandberg L.B., Soskel N.T. and Leslie J.G. - Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *The New England Journal of Medicine*, 304, (1981), 566-579.
- Sato K., Kobayashi K., Aida S. and Tamai S. - Bronchiolar expression of aquaporin-3 (AQP3) in rat lung and its dynamics in pulmonary oedema. *Pflugers Archiv*, 449, (2004), 106-114.
- Schuger L. - Laminins in lung development. *Experimental Lung Research*, 23, (1997), 119-129.
- Schoenwolf G.C., Bleyl S.B., Brauer P.R. and Francis-West P.H. - *Larsen's human embryology*, pp.319-336, Churchill Livingstone, 4ªed., (2009).
- Segade F., Trask B.C., Broekelmann T.J., Pierce R.A. and Mecham R.P. - Identification of a matrix-binding domain in MAGP1 and MAGP2 and intracellular localization of alternative splice forms. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, (2002), 11050-11057.

Sekine K., Ohuchi H., Fujiwara M., Yamasaki M., Yoshizawa T., Sato T., Yagishita N., Matsui D., Koga Y., Itoh N. and Kato S. - Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nature Genetics*, 21, (1999), 138-141.

Shenai J.P., Chytil F., Jhaveri A. and Stahlman M.T. - Plasma vitamin A and retinol-binding protein in premature and term neonates. *The Journal of Pediatrics*, 99, (1981), 302-305.

Shenai J.P., Chytil F. and Stahlman M.T. - Liver vitamin A reserves of very low birth weight neonates. *Pediatric Research*, 19, (1985), 892-893.

Shenai J.P., Kennedy K.A., Chytil F. and Stahlman M.T. - Clinical trial of vitamin A supplementation in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of Pediatrics*, 111, (1987), 269-277.

Shenai J.P. and Chytil F. - Vitamin A storage in lungs during perinatal development in the rat. *Biology of the Neonate*, 57, (1990a), 126-132.

Shenai J.P., Rush M.G., Stahlman M.T. and Chytil F. - Plasma retinol-binding protein response to vitamin A administration in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of Pediatrics*, 116, (1990b), 607-614.

Shenai J.P., Rush M.G., Parker R.A. and Chytil F. - Sequential evaluation of plasma retinol-binding protein response to vitamin A administration in very-low-birth-weight neonates. *Biochemical and Molecular Medicine*, 54, (1995), 67-74.

Shi W., Chen F. And Cardoso W.V. - *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6, (2009), 558-563.

Simonet W.S., DeRose M.L., Bucay N., Nguyen H.Q., Wert S.E., Zhou L., Ulich T.R., Thomason A., Danilenko D.M. and Whitsett J.A. - Pulmonary malformation in transgenic mice expressing human keratinocyte growth factor in the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92, (1995), 12461-12465.

Siracusa L.D., McGrath R., Ma Q., Moskow J.J., Manne J., Christner P.J., Buchberg A.M. and Jimenez S.A. - A tandem duplication within the fibrillin-1 gene associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Research*, 6, (1996), 300-313.

Siracusa L.D., McGrath R., Fisher J.K. and Jiménez S.A. - The mouse tight skin (Tsk) phenotype is not dependent on the presence of mature T and B lymphocytes. *Mammalian Genome*, 9, (1998), 907-909.

Skinner S.J.M. - Rapid method for the purification of the elastin cross-linked desmosine and isodesmosine. *Journal Chromatography*, 229, (1982), 200-204.

Snyder J.M. - Regulation of alveolarization. **In:** *Fetal and Neonatal Physiology*, vol.1, cap. 77, pp. 794-801, Ed. Polin R.A., Fox W.W. and Abman S.H., Saunders, 3ª edição, (2004).

Speer C.P. and Silverman M. - Issues relating to children born prematurely. *European Respiratory Journal*, 12, suppl.27, (1998), 13s-16s.

Speer C.P. - Inflammatory mechanisms in neonatal chronic lung disease. *European Journal of Pediatrics*, 158, (Suppl.1), (1999), S18-S22.

Spessotto P., Cervi M., Mucignat M.T., Mungiguerra G., Sartoretto I., Doliana R. and Colombatti A. -  $\beta$ 1 integrin-dependent cell adhesion to EMILIN-1 is mediated by the gC1q domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, (2003), 6160-6167.

Stahlman M.T., Orth D.N. and Gray M.E. - Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in the developing human respiratory system and in acute and chronic lung disease in the neonate. *Laboratory Investigation*, 60, (1989), 539- 547.

Stahlman M.T., Gray M.E. and Whitsett J.A. - Expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in fetal and neonatal human lung. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44, (1996), 673-678.

Takahashi Y.I., Smith J.E. and Goodman D.W. - Vitamin A and retinol-binding protein metabolism during fetal development in the rat. *American Journal of Physiology*, 233, (1977), E263-272.

Takase S., Ong D.E. and Chytil F. - Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247, (1986), 328-334.

Takeyama J., Suzuki T., Inoue S., Kaneko, C., Nagura H., Harada N. and Sasano H. - Expression and cellular localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human fetus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86, (2001), 2258-2262.

Ten Have-Opbroek A.A.W. - The development of the lung in mammals: an analysis of concepts and findings. *The American Journal of Anatomy*, 162, (1981), 201-219.

Ten Have-Opbroek A.A.W. - Lung development in the mouse embryo. *Experimental Lung Research*, 17, (1991), 111-130.

Tichelaar J.W., Lim L., Costa R.H. and Whitsett J.A. - HNF-3/Forkhead homologue-4 influences lung morphogenesis and respiratory epithelial cell differentiation *in Vivo*. *Developmental Biology*, 213, (1999), 405-417.

Toonkool P., Jensen S.A., Maxwell A.L. and Weiss A.S. - Hydrophobic domains of human tropoelastin interact in a context-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, (2001), 44575-44580.

Torday J.S. and Rehan V.K. - Does "A" stand for alveolization?. *European Respiratory Journal*, 23, (2004), 3-4.

Trask T.M., Trask B.C., Ritty T.M., Abrams W.R., Rosenbloom J. and Mecham R.P. - Interaction of tropoelastin with the amino-terminal domains of fibrillin-1 and fibrillin-2 suggests a role for the fibrillins in elastic fiber assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, n<sup>o</sup>32, (2000), 24400-24406.

Trotter A., Maier L. and Pohlandt F. - Management of the extremely preterm infant. Is the replacement of estradiol and progesterone beneficial? *Paediatrics Drugs*, 3, (2001), 629-637.

Urry D.W., Harris R.D., Long M.M. and Prasad K.U. - Polytetrapeptide of elastin. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 28, (1986), 649-660.

Urry D.W., Luan C. and Peng S.Q. - Molecular biophysics of elastin structure, function and pathology. *Ciba Foundation Symposium*, 192, (1995), 4-22.

Vaccaro C. and Brody J.S. - Ultrastructure of developing alveoli. I. The role of the interstitial fibroblast. *The Anatomical Record*, 192, (1978), 467-480.

Verkman A.S., Matthay M.A. and Song Y. - Aquaporin water channels and lung physiology. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 278, (2000), L867-879.

- Vrhovski B., Jensen S. and Weiss A.S. - Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin. *European Journal of Biochemistry*, 250, (1997), 92-98.
- Vrhovski B. and Weiss A.S - Biochemistry of tropoelastin. *European Journal of Biochemistry*, 258, (1998), 1-18.
- Wagle S., Bui A., Ballard P.L., Shuman H., Gonzales J. and Gonzales L.W. - Hormonal regulation and cellular localization of fatty acid synthase in human fetal lung. *American Journal of Physiology* 277 (Lung Cell Molecular Physiology 21), (1999), L381-390.
- Wang Z., Dollé P., Cardoso W.V. and Niederreither K. - Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives. *Developmental Biology*, 297, (2006), 433-445.
- Warburton D., Zhao J., Berberich M.A. and Bernfield M. - Molecular embryology of the lung: then, now and in the future. *American Journal of Physiology* 276, (Lung Cell Molecular Physiology 20), (1999), L697-L704.
- Weaver M., Yingling J.M. Dunn M.R., Bellusci S. and Hogan B.M.L. - Bmp signalling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development*, 126, (1999), 4005-4015.
- Weaver M., Dunn N.R. and Hogan B.M.L. - Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development*, 127, (2000), 2695-2704.
- Weaver T.E. and Conkright J.J. - Functions of surfactant proteins B and C. *Annual Review of Physiology*, 63, (2001), 555-578.
- Weihua, Z., Makela S., Andersson LC., Salmi S., Sagi S., Webster JI., Jensen EV., Nilsson S., Warner M. and Gustafsson JA. - A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98, (2001), 6330-6335.
- Weis-Fogh T. and Andersen S.O. - New molecular model for the long-range elasticity of elastin. *Nature*, 227, (1970), 718-721.
- Wendel D.P., Taylor D.G., Albertine K.H., Keating M.T. and Li D.Y. - Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 23, (2000), 320-326.
- Wert S.E. - Normal and abnormal structural development of the lung. **In:** *Fetal and Neonatal Physiology*, vol.1, cap.76, pp. 783-794, Ed. Polin R.A., Fox W.W. and Abman S.H., Saunders, 3ª edição, (2004).
- Williams M.C., Cao Y., Hinds A., Rishi A.K. and Wetterwald A. - T1 alpha protein is developmentally regulated and expressed by alveolar type I cells, choroid plexus, and ciliary epithelia of adult rats. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 14, (1996), 577-585.
- Winnier G., Blessing M., Labosky P.A. and Hogan B.L. - Bone morphogenetic protein- 4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & Development*, 9, (1995), 2105-2116.
- Wolbach S.B. and Howe P.R. - Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *The Journal of Experimental Medicine*, 42, (1925), 753-777.
- Wolbach S.B. and Howe P.R. - Epithelial repair in recovery from vitamin A deficiency. An experimental study. *The Journal of Experimental Medicine*, 57, (1933), 511-526.

Wongtrakool C., Malpel S., Gorenstein J., Sedita J., Ramirez M.I., Underhill T.M. and Cardoso W.V. - Down-regulation of retinoic acid receptor  $\alpha$  signaling is required for sacculation and type I cell formation in the developing lung. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, (2003), 46911-46918.

Wright C., Strauss S., Toole K., Burt A.D. and Robson S. - Composition of the pulmonary interstitium during normal development of the human fetus. *Pediatric and Development Pathology*, 2, (1999), 424-431.

Yanagisawa H., Davis E., Starcher B., Ouchi T., Yanagisawa M., Richardson J. and Olson E. - Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature*, 415, (2002), 168-171.

Zeng X., Wert S.E., Federici R., Peters K.V. and Whitsett J.A. - VEGF enhances pulmonary vasculogenesis and disrupts lung morphogenesis in vivo. *Development Dynamics*, 211, (1998), 215-227.

Zhang H., Apfelroth S.D., Wei H., Davis E.C., Sanguineti C., Bonadio J., Mecham R.P. and Ramirez F. - Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *The Journal of Cell Biology*, 124, (1994), 855-863.

Zhang H., Hu W and Ramirez F. - Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *The Journal of Cell Biology*, 129, (1995), 1165-1176.

Zhang H., Timpl R., Sasaki T., Chu M. and Ekblom P. - Fibulin-1 and fibulin-2 expression during organogenesis in the developing mouse embryo. *Development Dynamics*, 205, (1996), 348-364.

Zhao D., McCaffery P., Ivins K.J., Neuf R.L., Hogan P., Chin W.W. and Drager U.C. - Molecular identification of a major retinoid-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *European Journal Biochem*, 240, (1996), 15-22.

Zhou L., Lim L., Costa R.H. and Whitsett J.A. - Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3 $\beta$ , surfactant protein B, C and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44, (1996), 1183-1193.