MARIA ROSELI MONTEIRO CALLADO

**Caracterização da resposta imune em
modelo experimental de esclerodermia
induzida por colágeno tipo V**

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

Área de concentração: Reumatologia

Orientador: Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari

**São Paulo
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Callado, Maria Roseli Monteiro

Caracterização da resposta imune em modelo experimental de esclerodermia induzida por colágeno tipo V / Maria Roseli Monteiro Callado. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Reumatologia.

Orientador: Natalino Hajime Yoshinari.

Descritores: 1.COELHOS 2.MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS
3.ESCLERODERMIA DIFUSA/induzido quimicamente 4.COLÁGENO/efeitos
adversos 5.ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO 6.FORMAÇÃO DE ANTICORPOS/
imunologia

USP/FM/SBD-139/05

Aos Profs. Drs. Natalino Yoshinari e Walcy Teodoro que me confiaram seu
projeto.

Para Prof. Dra. Eloísa Bonfá pela oportunidade especial de me tornar
doutora.

Para Dra. Vilma Trindade que tanto trabalhou e aprimorou meu pensamento
científico.

Ao Prof. Dr. Wiliam Chahade que me apresentou a especialidade onde me
realizei profissionalmente.

Dedico, por fim, a todos aqueles que compõem a disciplina de Reumatologia,
em especial às companheiras Ana Paula, Cleonice, Elaine, Eliane, Francisca
e Margareth.

Em memória de meu pai, Pedro, que temeu um retorno para São Paulo...

Para minha mãe, Carmélia, que muito cedo entendeu minha inquietação e
curiosidade.

Para meu esposo, Carlos Ivan, que conjuga comigo todos os verbos que
compõem o verdadeiro amor.

Para meus filhos, Renato, Rômulo e Carla, cuja independência e curiosidade
científica procurei despertar desde a infância.

Para Dra. Cidália Martinho e Dona Maria, amigas verdadeiras.

Agradecer...

Agradecer ao SER

Por nos conceder

Mente

Para reconhecer

Gente...

Felicidade é: conviver e aprender

Pacientemente

Com tantos entes

Diferentes

Que nos ajudam a crescer

Sem esquecer

De ser sempre uma

Semente

Que irá nascer

Em outro ser

E florescer eternamente

Passando o saber....

Fortaleza, 28 de Maio de 2005

A mulher na Reumatologia da USP

Ela está em todo lugar
Não é possível nomear
A importância ao ocupar
Da cátedra até o lavar
Sempre a zelar e honrar
O posto na universidade
Que é pujante em criar,
Conservando sempre
Sua sensibilidade de mulher !

É difícil agradecer
Sempre podemos esquecer...
Com tantos nomes de A a Z !

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	11
CONSIDERAÇÕES BÁSICAS.....	18
O tecido conjuntivo.....	18
Colágeno tipo V.....	19
Adjuvante de Freund.....	24
Auto-anticorpo anticolágeno.....	25
Proteínas com domínio colágeno- <i>like</i>	27
Esclerodermia.....	29
2. OBJETIVOS.....	34
3. METODOLOGIA.....	35
3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	35
Animais.....	35
Soroteca adicional.....	36
3.2. MÉTODOS.....	37
ELISA para pesquisa de anticorpo anticolágeno.....	37
Aglutinação de látex para detecção de fator reumatóide.....	38
Imuno-hemólise para dosagem do complemento total.....	38
ELISA para pesquisa de imunocomplexos circulante.....	39
Imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinucleares.....	40

<i>Immunoblot</i> para detecção de auto-anticorpos.....	42
4. RESULTADOS.....	49
Pesquisa de anticorpo anticolágeno.....	49
Detecção de fator reumatóide.....	55
Dosagem do complemento total.....	55
Pesquisa de imunocomplexos circulante.....	56
Detecção de anticorpos antinucleares.....	57
Detecção de auto-anticorpos pela técnica de <i>immunoblot</i>	66
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÕES.....	88
ANEXOS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

RESUMO

Os modelos experimentais reproduzem doenças que acometem seres humanos, sendo de extrema importância porque possibilitam o estudo da patogênese e abordagem terapêutica dessas enfermidades. Nesse grupo inclui-se o modelo experimental de esclerodermia induzida pela imunização de coelhos com colágeno V humano provocando alterações histológicas (pele, pulmão e rim) similares àquelas observadas em humanos. As doenças auto-imunes têm sua etiologia desconhecida e são particularmente caracterizadas pela presença de auto-anticorpos no soro. Nesse aspecto, 90 a 95% dos pacientes com esclerodermia apresentam algum auto-anticorpo contra antígenos intracelulares (proteínas nucleolares RNA polimerase I, II e III, Scl-70, centriolares ou golginas) ou da matriz extracelular (colágeno). O presente estudo tem como objetivo avaliar a resposta imunológica nos animais do modelo experimental de esclerodermia. Para tanto, o soro dos animais foram testados quanto à presença de auto-anticorpos e de outros fatores imunológicos séricos que indicassem um processo imunológico ativo paralelo às lesões teciduais em desenvolvimento e incluiu: pesquisa de anticorpos anticolágenos V, III e I, imunocomplexos circulantes, fator reumatóide, níveis de complemento, fatores antinucleares (FAN) por imunofluorescência indireta em células HEp-2 e caracterização dos antígenos alvos por *immunoblot*. A análise da resposta imune revelou que as alterações histológicas do pulmão, rim e pele se desenvolviam com o aumento dos níveis séricos de anticorpos anti-colágeno V. Além disso, todos

os animais imunizados com Col V apresentavam anticorpos para outros tipos de colágeno. Esses animais desenvolveram uma marcante resposta imunológica a antígenos intracelulares com 100% de positividade para o FAN e presença de imunocomplexos nos soros obtidos 30, 75 e 120 dias pós-imunização quando comparados a dois grupos controles (albumina e adjuvante completo de Freud). Todos os animais do grupo Col V apresentaram na IFI padrão citoplasmático *Golgi símile* e, em 10% deles, reatividade adicional aos centríolos. Ambos auto-anticorpos são raros, mas já descritos em pacientes com esclerodermia. A pré-absorção dos soros desses animais com Col V não interferiu no resultado do FAN. A caracterização dos antígenos alvos mostrou uma reatividade uniforme a proteínas de alto peso molecular de células epiteliais humanas (≥ 175 kDa) que progredia com o tempo de imunização. Eluatos ácidos contendo os anticorpos anti-fração 175 kDa reproduziram o padrão de IFI igual ao soro original. As análises demonstram que a imunização com Col V humano em coelhos resulta numa resposta imunológica exuberante e que se caracteriza pela presença de auto-anticorpos a componentes intracelulares.

SUMMARY

Experimental models for human diseases are of utmost importance, since they allow the study of their pathogenesis and therapeutic approach. In this group we can include the experimental model of collagen V-induced scleroderma, in rabbits, with histological alterations (skin, lung and kidney) similar to those observed in humans. Auto-immune diseases have an unknown etiology, and are characterized by the presence of auto-antibodies in serum. In this aspect, 90%-95% of the patients with scleroderma present some kind of auto-antibody against intracellular antigens (RNA polymerase I, II and III nucleoproteins, Scl-70, centriolar or golgins) or to components of the extracellular matrix (collagen). This study aims to assess the immune response of the animal subjects in a scleroderma experimental model. The animals' sera were tested for auto-antibodies and other serum immunological factors that would point to an active immunological process, parallel to the developing tissue lesions, including anti-collagen V, III and I antibodies, circulating immune complexes, rheumatoid factor, complement levels, antinuclear antibodies (ANA) by indirect immunofluorescence in HEp-2 (IFI) cells, and characterization of target antigens with an immunoblot. The analysis of the immune response in the studied animals revealed that histological alterations in lungs, kidneys and skin developed with an increase of the serum levels of anti-collagen V antibodies. Furthermore, all the Col V-immunized animals presented antibodies against other types of collagen as well. These animals also developed a strong immune response against

intracellular antigens, being 100% positive for ANA, showing also immune complexes in sera obtained 30, 75 and 120 days after immunization with Col V, when compared to the control groups (albumin and Freund's complete adjuvant). All the animals from the Col V group showed a cytoplasmic pattern at the IFI, *Golgi simile* and, in 10% of the cases, additional reactivity to the centrioles. Both auto-antibodies are rare, yet were already described in patients with scleroderma. The pre-absorption of these animals' sera with Col V did not interfere with the ANA reactivity. The characterization of the target antigens showed a uniform reactivity to high molecular weight proteins of human epithelial cells (≥ 175 kDa), which progressed with the immunization time. Acid eluates containing antibodies against the 175 kDa fraction reproduced the same IFI reactivity pattern of the original serum. The results demonstrate that immunization of rabbits with human Col V results in an exuberant immune response, characterized by the presence of auto-antibodies against intracellular components.

1. INTRODUÇÃO

Inúmeros são os modelos animais que tentam reproduzir as alterações encontradas nas enfermidades auto-imunes relacionadas ao tecido conjuntivo, no intuito de compreender o mecanismo fisiopatológico envolvido nestas doenças. O modelo ideal de auto-imunidade deve conter as alterações clínicas e histológicas da patologia humana e a presença de auto-anticorpos.

A fisiopatologia das doenças auto-imunes e da rejeição a transplantes começou a ser compreendida em 1967, quando DAUSSET, em colaboração com RAPAPPORT, chegou à conclusão de que os transplantes entre membros da mesma família, com idêntico complexo maior de histocompatibilidade (CMH), tinham maior probabilidade de sucesso do que quando os tipos antigênicos eram diferentes. DAUSSET foi ainda o primeiro cientista a associar o CMH com as doenças, o que levou outros pesquisadores a explorar esta possibilidade, comprovando a associação do padrão antigênico dos linfócitos com o maior risco de adquirir doenças auto-imunes, como artrite reumatóide (AR) e diabetes. Seu intercâmbio científico com outros pesquisadores da mesma área, especialmente com BENACERRAF e SNELL, proporcionou-lhes a premiação conjunta do Nobel de Medicina em 1980.

Os modelos experimentais em animais para esclerodermia ou esclerose sistêmica (ES), descritos até hoje, não conseguem apresentar alterações completas para que sejam considerados específicos para esta

doença (MORROW et al., 1999). Um primeiro modelo foi descrito em ratos Sprague-Dawley que, com 48 horas de vida, receberam injeção intraperitoneal de grande quantidade de células linfóides de um doador com linhagem não relacionada. Estes animais, quando adultos, receberam transplantes de pele e desenvolveram doença homóloga com algumas características de esclerodermia (STASTNY et al., 1963).

Helen Bunker, em 1968, descreveu um modelo natural em camundongos denominados *TSK-mouse* (pele fixa), que apresentam características físicas, histopatológicas e bioquímicas da pele muito semelhantes a ES. Mas, falta a este modelo o infiltrado inflamatório mononuclear presente na fase inicial da doença, os apêndices da pele são melhor preservados e não ocorrem lesões em órgãos internos, sendo portanto um bom modelo para uso restrito ao estudo das anormalidades de síntese dos colágenos (OSBORN et al., 1983; JIMENEZ et al., 1986). Outra crítica a este modelo é sua origem genética, pois, em humanos, a ES não tem a hereditariedade como fator primário em sua etiologia (RUZEC et al., 2004). No entanto, desde 1991, um grupo de pesquisadores da Escola de Medicina Mont Sinai, em Nova York, analisou intensamente aspectos imunológicos deste modelo. Auto-anticorpos anti-topoisomerase I (Anti-Scl-70) e anti-RNA polimerase I já foram encontrados nestes animais (MURYOI et al., 1991; SHIBATA et al., 1993; HATAKEYAMA et al., 1996; SAITO et al., 1999). Em 1993, os autores selecionaram um anticorpo monoclonal RNA-polimerase I que apresenta reação cruzada com RNA polimerase da *Escherichia coli*.

Por outro lado, uma doença em galinhas brancas da raça Leghorn foi descrita com características de ES, como o infiltrado mononuclear e o desenvolvimento de fibrose na pele e órgãos internos. No entanto, esta patologia apresenta um quadro clínico agudo, com resposta inflamatória intensa, hipertrofia muscular e glomerulonefrite (GERSHWIN et al., 1981) e, por ser um modelo em aves, é difícil a sua correlação clínica com a doença em humanos (RUZEC et al., 2004).

RUSEK et al., em 2004, descreveram um novo modelo para ES, induzido por reação enxerto-hospedeiro, em camundongos imunodeficientes que receberam células esplênicas de animais normais. As características da doença induzida foram semelhantes àsquelas da esclerodermia no homem, com dano vascular, ativação do sistema imune, evidenciada pela presença de FAN nuclear pontilhado e Anti-Scl-70 em 90% dos animais estudados, porém ocorreu uma fibrose pulmonar, renal e cardíaca muito pequena, que foi atribuída ao término precoce dos experimentos.

Estudos realizados em animais, através da sensibilização com colágenos, mostraram que é possível induzir alterações na cartilagem articular semelhantes às encontradas na AR. Em experimentos onde foram utilizados como imunógenos os colágenos II, IX e XI, constituintes mais abundantes na cartilagem, foram obtidos importantes resultados para a compreensão do mecanismo fisiopatológico envolvido no processo inflamatório da AR (CREMER e ROSLONIEC, 1998).

O modelo de esclerodermia analisado neste estudo foi descoberto casualmente no Laboratório de Matriz Celular da Disciplina de Reumatologia

da USP, quando coelhos foram imunizados com colágeno tipo V humano (Col V) e adjuvante completo de Freund (ACF) para obtenção de anticorpos policlonais antiCol V. Nos animais imunizados foram observadas alterações macroscópicas, particularmente em pulmões, que eram reproduzidas em novos coelhos submetidos ao mesmo procedimento. Devido a este fenômeno, foi realizada análise histológica preliminar do tecido pulmonar, revelando a presença de importante processo inflamatório, depósito de colágeno no interstício e ao redor de vasos e brônquios. Surpreendentemente, este fenômeno não ocorria quando os colágenos dos tipos I e III eram inoculados nas mesmas condições. Visando averiguar as dimensões científicas desta descoberta original, a qual poderia tornar-se um novo modelo para o estudo das doenças inflamatórias pulmonares, foi estabelecido um protocolo de pesquisa em conjunto com o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, através da Professora Doutora Vera Capelozzi. As análises histopatológicas demonstraram que alterações pulmonares eram proeminentes nos animais imunizados com Col V, quando comparado com o grupo controle de ACF (FIGURA 1). De fato, foram observadas alterações, principalmente na periferia dos lobos basais, com o espessamento da íntima vascular causando oclusão de pequenas artérias, veias e brônquios e intensa vasculite com predomínio de neutrófilos. Houve também espessamento da camada média de artérias de maior calibre, em decorrência do depósito de colágeno, além de fibrose inicial do parênquima pulmonar, especialmente em áreas próximas aos vasos e brônquios. Concluiu-se, então, que o modelo reproduzia achados histológicos

compatíveis com doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC). Exames sorológicos demonstraram ainda que essas alterações histológicas eram acompanhadas pelo desenvolvimento de anticorpos dirigidos contra o Col V inoculado, bem como contra os colágenos tipos I e III (TEODORO, 2001; TEODORO et al., 2004).

Considerando-se que os resultados obtidos sugeriam a presença de DDTC, novas pesquisas foram programadas, supondo-se que as alterações morfológicas não estivessem restritas ao pulmão. De fato, análises histopatológicas dos órgãos habitualmente lesados nestas enfermidades, incluindo-se pele (FIGURA 2), coração, rins (FIGURA 3), esôfago, sinóvia e articulação, demonstraram comprometimento em múltiplos órgãos. Dentre os aspectos histológicos, chamava a atenção o nítido remodelamento do tecido conjuntivo, com o incremento do tecido fibroso pelo acúmulo de colágenos e infiltrado inflamatório (linfócitos e granulócitos). Este remodelamento matricial observado nos tecidos confirmou o aspecto sistêmico do modelo, com características muito semelhantes aos encontrados na esclerose sistêmica (YOSHINARI et al., 2002). O aparecimento de auto-anticorpos anticolágeno I e III foi confirmado e estava relacionado com o tempo de imunização e agravamento das lesões histológicas.

FIGURA 1: Pulmão de coelhos imunizados com ACF, albumina e Col V humano, aos 75 dias. Coloração de hematoxilina-eosina e T. Masson. Evidência de espessamento da parede arterial e brônquica.

FIGURA 2: Pele de coelhos imunizados com ACF, albumina e Col V, aos 75 dias. Coloração de hematoxilina-eosina e T. Masson. Evidência de aumento da fibrose com diminuição dos anexos.

FIGURA 3: Rim de coelhos imunizados com ACF, albumina e Col V, aos 75 dias. Coloração de hematoxilina-eosina e T. Masson. Evidência de fibrose vascular.

Desde então, este modelo tem sido objeto de pesquisa em análises morfológicas teciduais e imunológicas para esclarecimento da sua patogênese. Avanços no estudo morfológico têm sido evidentes, pois diferentes órgãos foram analisados em profundidade.

A avaliação do padrão de comprometimento articular com as análises morfológicas e bioquímicas de sinóvia revelaram-se compatíveis com esclerodermia. Predominava o remodelamento sinovial associado ao aumento da matriz extracelular, escasso infiltrado inflamatório, acometimento vascular com lesão da camada endotelial, proliferação da íntima e obliteração do lúmen (TEODORO et al., 2003). Descobriu-se também que as fibras de colágenos sintetizadas, tanto *in vivo* como *in vitro* (cultura de fibroblastos), apresentavam-se morfolologicamente semelhantes,

porém bem distintas quando comparadas às expressas por fibroblastos de pele de indivíduos normais, revelando que a fibrilogênese encontrava-se modificada neste modelo animal, à semelhança do observado na esclerodermia. Este dado inusitado indica que a síntese de fibrilas de colágenos, particularmente tipo V, aumentada tanto no paciente como no modelo animal, poderia ser responsável pela formação da placa esclerodérmica, ou seja, endurecimento da pele (PRIZON, 2003). A análise histológica seqüencial da pele num mesmo animal, realizada com auxílio de biópsias no dorso do coelho, em áreas distintas, mostrou que as alterações são progressivas, com acúmulo do tecido fibroso, como resultado da deposição de colágenos dos tipos I, III e V, além da atrofia dos anexos (OLIVEIRA, 2005).

Na tentativa de explicar os fatores desencadeantes das alterações morfológicas observadas neste modelo experimental, sugeriu-se como fator principal as particularidades biológicas do Col V empregado como antígeno.

CONSIDERAÇÕES BÁSICAS

O TECIDO CONJUNTIVO

Este tecido é composto pela matriz extracelular, definida como uma malha estrutural composta por colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas, que envolvem as células do estroma, endoteliais e epiteliais subjacentes (HAY, 1981). Além disto, esta matriz funciona como moduladora

dinâmica de vários processos biológicos ao liberar fatores de crescimento, citocinas e interagir com receptores da superfície celular.

A matriz extracelular é classicamente dividida em dois componentes principais, denominados fibrilar e fundamental. O fibrilar está representado pelas fibras de colágenos, elastina e reticulina. O fundamental é composto pelas proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas (HAY, 1991).

Embora o colágeno e as fibras elásticas sejam os maiores constituintes da matriz extracelular, sua função global é definida pela inter-relação entre os seus vários componentes (PETTY e RENNARD, 2000).

As células envolvidas pela matriz apresentam receptores de superfície, dentre eles as integrinas que possuem importante papel no processo biológico de cicatrização, crescimento e sobrevivência celular (HYNES, 1992). Estes receptores são responsáveis pelo reconhecimento de regiões específicas de várias moléculas da matriz extracelular. Um exemplo é a seqüência RGD, formada pelos aminoácidos arginina, glicina e ácido aspártico, que está expressa em todas as células com função adesiva, sendo por esta razão essencial para uma série de eventos de remodelamento celular (GIANCOTTI e RUOSLAHTIE, 1999).

COLÁGENO TIPO V

Atualmente estão descritos 14 tipos distintos de colágenos. O colágeno tipo V faz parte da família dos fibrilares, juntamente com os tipos I, II, III e XI (PROCKOP, 1995).

O Col V foi originalmente descrito em placenta humana (CHUNG et al., 1976) e em pele (SAGE e BORNSTEIN, 1979). Está amplamente distribuído e parece ser mais sintetizado durante o desenvolvimento do processo fibrótico. É encontrado na lâmina fibroreticular e ancora a membrana basal ao estroma (TAKAI et al., 2001). Como todos os colágenos, o Col V é sintetizado na forma de procolágeno, contendo uma longa região de tripla hélice, um pequeno domínio carboxi-terminal e um grande domínio amino-terminal, os quais são denominados de domínios globulares (FIGURA 4). Quando os colágenos são secretados para o meio extracelular, normalmente perdem estes domínios. Curiosamente, o tipo V mantém os dois domínios durante a sua síntese (HAY, 1991). Estas regiões são reconhecidas como altamente imunogênicas. (KONOMI et al., 1984).

FIGURA 4: Modelo de estrutura molecular do colágeno

Dois modelos de localização e organização do Col V têm sido propostos (FESSLER, 1986): o primeiro considera que o Col V formaria um

eixo central com fibrilas colágenas contendo primariamente Col I (van DER REST e GARRONE, 1991), e o segundo (LINSENMAYER et al., 1993) propõe que as moléculas do Col V e do tipo I ficariam interpostas, enquanto o Col V se distribuiria com suas extremidades aminoterminais curvadas devido à flexibilidade do telopeptídeo, e se disporia como um braço que se estende para a superfície fibrilar, regulando o diâmetro da fibra (FIGURA 5).

FIGURA 5: Estrutura molecular do Col V (em vermelho), com sua porção aminoterminal se estendendo para a superfície. (LINSENMAYER et al., 1993)

O Col V, embora presente em pequena quantidade nos tecidos, tem ampla distribuição, principalmente na córnea, fígado, baço, pulmão e pele (ADACHI et al., 1987; ADACHI et al., 1991; DRAZEN et al., 2000). Na pele, ele é encontrado em menor proporção que os outros colágenos, como os tipos I, III, IV, VI e VII. Ele é responsável pela regulação do diâmetro das fibras de Col I através da formação de fibras heterotípicas constituídas pelos tipos I e V, onde normalmente epítomos deste colágeno encontram-se ocultos (CRYSTAL e col, 1997). Sua presença na membrana basal de vasos

e em alguns tecidos mesenquimatosos desempenha importante papel de ligação entre o Col IV, principal componente fibrilar da membrana basal, bem como a diferentes componentes celulares e moleculares, contribuindo no crescimento e remodelamento da estrutura tecidual (INKINEN et al., 1999; FICHARD et al., 1995). A perfeita modulação dos colágenos fibrilares presentes nestes vasos é essencial para manter a função do tecido vascular (MESTRIES et al., 2001). As células musculares lisas de artérias produzem a cadeia alfa-1 do colágeno tipo XI, participando juntamente com os tipos I, III e V na manutenção da arquitetura estrutural do tecido conjuntivo das artérias. (von DER MARK et al., 1982).

Na sinóvia e cartilagem articular, o Col V apresenta similaridade molecular com o colágeno tipo XI (CREMER e ROSLONIEC, 1998), importante componente fibrilar na manutenção da arquitetura da cartilagem articular (LAWRENCE et al., 1994).

Experimentos de fibrilogênese *in vitro*, realizados em camundongos transgênicos, indicam que o Col V regula a formação de fibras heterotípicas, interferindo no processo de formação “*in vivo*” de fibras de Col I. Exemplo clássico deste processo é encontrado na síndrome de Ehlers-Danlos, doença caracterizada pela mutação gênica do Col V. Outro aspecto importante na síntese das fibras de Col V, mas que permanece obscuro, é a função de seu fragmento proteolítico NH₂-terminal da cadeia α_3 (V). Este domínio apresenta a maior seqüência de aminoácidos de todas as cadeias α de colágeno, mas sua distribuição é limitada nos tecidos, podendo refletir maior nível de especialização desta molécula (IAMAMURA et al., 2000).

Claramente, o Col V é fundamental não somente para regular o diâmetro das fibras, mas também a integridade do tecido conjuntivo, apresentando funções diferentes, dependendo da sua distribuição e isoformas moleculares.

MARES et al., em 2000, trabalhando com modelo de rejeição a transplante em pulmão de murinos, mostraram que o Col V também é alvo da resposta imune para aloantígenos. Foi observado pelos autores que o sítio de lesão patológica em resposta a aloantígenos parece ocorrer principalmente nos tecidos em que o Col V está localizado, como por exemplo, no tecido conjuntivo peribronquiolar, interstício alveolar e membrana basal dos capilares.

Além destes achados, HAQUE et al., em 2002, encontraram células T específicas para o Col V durante os episódios de rejeição do enxerto de pulmão e verificaram que estas células podem contribuir para patogênese das respostas à rejeição. Foi também sugerido pelos autores que, sendo o Col V uma molécula altamente conservada entre indivíduos e espécies, ele pode se tornar um antígeno durante as respostas de rejeição, visto que este colágeno apresenta-se com concentrações mínimas no pulmão, encontrando-se oculto no interior das fibrilas heterotípicas, das regiões perivasculares e peribronquiolares. Durante o processo de rejeição e inflamação, o tecido sofre a ação das metaloproteinases, como a MMP-2 e MMP-3, e estas enzimas são capazes de clivar e expor o Col V, tornando-o imunogênico e, deste modo, os diferentes peptídeos desta molécula poderiam induzir aloreatividade, desempenhando papel importante na rejeição do enxerto e remodelamento pulmonar.

ADJUVANTE DE FREUND

Os adjuvantes são substâncias utilizadas como artifícios para ajudar na resposta antigênica a vacinas, desde 1920. Existem muitos tipos descritos, todos eles tóxicos, tendo seu uso o objetivo inicial de estimular a formação de granulomas no local da aplicação, melhorando assim o tempo de exposição do antígeno inoculado e facilitando sua concentração no local. As emulsões oleosas são relatadas também como modificadoras físicas dos antígenos, pois as micelas oleosas formadas junto a estes mudam sua conformação, expondo epítomos antigênicos que estariam ocultos nas moléculas originais. Os adjuvantes são considerados facilitadores da resposta timo dependente ao melhorar a cooperação entre os linfócitos T e B. Na composição do ACF estão presentes óleo e bacilos da tuberculose mortos, que são relatados na literatura como indutores de artrites em ratos (HEYMER et al., 1982; KNIGHT et al., 1992; ELLIS et al., 1992). O adjuvante incompleto de Freund (AIF) é constituído apenas da emulsão oleosa e normalmente é utilizado para finalizar o processo de imunização.

O coelho é uma espécie animal que não desenvolve artrite com adjuvante completo/incompleto de Freund, nem tampouco quando associado ao colágeno tipo II. O modelo de artrite induzido por antígeno (adjuvante completo mais albumina bovina) reproduz artrite apenas na articulação inoculada com albumina, em animal previamente sensibilizado (MORROW et al., 1999).

AUTO-ANTICORPO ANTICOLÁGENO

A importância da antigenicidade dos colágenos já foi demonstrada em estudos que identificaram anticorpos anticolágenos I, II, IV e V em pacientes com vasculites e lúpus eritematoso sistêmico (LES), sendo que, provavelmente, os colágenos IV e V estariam envolvidos no processo de perpetuação da lesão vascular (MORELAND et al., 1991).

Auto-anticorpos anticolágenos tipo I e IV, em níveis significantes, foram encontrados e correlacionados com disfunção da capacidade pulmonar em pacientes com esclerodermia. Estes colágenos localizam-se em diferentes posições na matriz extracelular, estando o colágeno IV relacionado com a membrana basal celular e o tipo I encontrado no interstício. Os autores demonstraram, por técnica de adsorção, que estas reações eram específicas, não ocorrendo reação cruzada entre os dois auto-anticorpos. Estes achados sugerem que lesões endoteliais estão intimamente associadas com lesão e reparação da membrana basal celular, participando da patogênese desta enfermidade (MACKEL et al., 1982).

Foi detectada ainda a positividade para anticorpos antiCol V em pacientes com esclerodermia, assim como em processos de vasculite e LES (RIENTES et al., 1995). COLONIA, em 1997, também demonstrou anticorpos contra o colágeno tipo V em várias DDTC, com as seguintes frequências: 12,9% em AR, 18% em doença mista do tecido conjuntivo (DMTC), 42% no LES e 46,9% na esclerodermia.

Além disso, a presença de auto-anticorpos específicos para o colágeno tipo VII também foi observada na síndrome de Sjögren (FUJI et al., 1998).

A indução de anticorpos anticolágeno em humanos foi documentada através da injeção de colágeno para correção de contornos em partes moles. Os implantes consistem em mais de 95% de colágeno I e o restante de colágeno tipo III, considerados imunógenos fracos. Numa casuística de 500.000 aplicações de colágeno em pacientes dos Estados Unidos da América e Canadá, observou-se que, aproximadamente 3% da população desenvolveu hipersensibilidade iniciada na pele já nas primeiras 72 horas da aplicação. Hipersensibilidade localizada sobre o implante ocorreu em 1% dos pacientes e foram registrados desenvolvimento de doenças auto-imunes, incluindo 11 casos de dermatopolimiosite (GUOQIU, 1996). No entanto, este mesmo autor refere uma incidência de anticorpos anticolágeno I desnaturado em 5% da população normal, presumivelmente desenvolvidos pela exposição alimentar.

Registra-se, também, que alguns autores demonstraram a não correlação entre a presença de anticorpos anticolágenos com a AR ou outras doenças (ELSON, 1993; FREY et al., 1994) .

Estudo realizado com pacientes lúpicos identificou auto-anticorpos contra a porção *colágeno-like* do C1q, que apresentam reação cruzada com colágenos (ANTES et al., 1988). A fração C1q do sistema complemento faz parte da família protéica das colectinas. O auto-anticorpo anti-C1q região *colágeno-like* (CLR) é da classe IgG e seu papel patogênico é ainda incerto.

É um marcador diagnóstico para síndrome vasculítica urticariforme com hipocomplementemia. Frequentemente está associado a glomerulonefrites com forma proliferativa no LES e tem sido demonstrada uma correlação entre a presença de anti-CLR e anti-DNA de dupla hélice, que é um marcador para doença renal em atividade. Apesar de ser encontrado com frequência nos pacientes com glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo I e em pacientes com antimembrana basal glomerular (anti-GBM), o anti-CLR não mostrou significância diagnóstica ou prognóstica nestas doenças. Anti-CLR da classe IgA é freqüente em pacientes com vasculite reumatóide, mas seu papel diagnóstico não é claro (WENER et al., 1996).

PROTEÍNAS COM DOMÍNIO COLÁGENO-LIKE

Este grupo de proteínas é denominado de colectinas e caracteriza-se pela presença em sua estrutura de um domínio *colágeno-like* e de um domínio de lectina cálcio dependente que é um sítio de ligação a carboidratos. As colectinas desempenham um papel importante no sistema de imunidade natural, ao reconhecerem receptores na parede dos microrganismos que ativam o sistema complemento através da ligação com o componente C1q, que também é uma colectina. Dentre estas proteínas destacam-se aquelas fixadoras de manose (PFM) pela sua importância no processo de fagocitose, incluindo-se a PFM plasmática e os receptores de manose existentes nos macrófagos. Estas iniciam o processo de opsonização de microorganismos após a interação com as regiões terminais de manose e fucose da superfície glicoprotéica e glicolipídica, típicas das

paredes de microorganismos. Sua estrutura hexagonal é similar ao componente C1q, mas as PFM podem ainda interagir com duas outras proteínas do sistema complemento, C1s e C1r. As PFM circulantes no plasma estão fisicamente associadas às serinoproteases, que ativam diretamente o componente C3, fazendo um *by-pass* em ambas as vias de ativação (clássica e alternada). Este novo caminho é chamado de via de ativação do complemento pelas lectinas (ABBAS et al., 2000).

As moléculas de C1q e PFM fixam-se aos macrófagos através da calreticulina, iniciando o processo de apoptose celular. A calreticulina é uma molécula de reticulina ligada ao cálcio. Esta também apresenta em sua estrutura um domínio colágeno-*like* e, como já foi citado anteriormente, faz parte do componente fibrilar do tecido conjuntivo. A calreticulina foi primeiramente caracterizada como uma proteína transportadora de cálcio no retículo endoplasmático celular, sendo também localizada em membranas celulares e livres no plasma. Outras funções adicionais já foram descritas para esta colectina, tais como: fixadora de integrinas, inibidora da angiogênese, moduladora de receptores para hormônios esteróides, além de apresentar a propriedade de fixar perforin (molécula produzida pelo linfócito T citotóxico que forma uma cunha transmembranar na célula-alvo, levando a lise celular) (STEINO et al., 2004).

Pertencem também a esta família as proteínas surfactantes pulmonares A e D, que reduzem a tensão superficial do meio; a congulinina bovina, que é capaz de fixar C3b, levando à aglutinação destas partículas

(LOOS e COLOMB, 1993) e a acetilcolinesterase, enzima que hidrolisa acetilcolina em ácido acético e cofator A (ANTES et al., 1988).

Pelo exposto, supõe-se que o modelo animal de esclerodermia induzido em coelhos, por Col V, leva à produção de anticorpos que reagiriam cruzadamente com várias proteínas teciduais do hospedeiro, como resultado de possível homologia molecular entre o Col V autólogo e as colectinas teciduais.

ESCLERODERMIA

As doenças do espectro esclerodérmico abrangem uma ampla variedade de patologias definidas pela extensão do endurecimento da pele. Quando a esclerodermia envolve outros órgãos, além do quadro cutâneo, é denominada de esclerose sistêmica (ES).

Esta doença do tecido conjuntivo de etiologia desconhecida é caracterizada por alterações vasculares e síntese excessiva de colágenos tipo I, III, V, VI e VII. A produção aumentada de matriz extracelular pelos fibroblastos é atribuída a anormalidades na interação entre as células endoteliais, os linfócitos, os monócitos e os fibroblastos, levando a uma hiperreatividade do tecido vascular e hipóxia tecidual. Fibroblastos cutâneos de pacientes com esclerodermia, quando cultivados *in vitro*, produzem quantidade aumentada de colágeno dos tipos I e III, se comparados aos de indivíduos saudáveis do mesmo sexo e idade (UITTO et al., 1979; JIMENEZ et al., 1986).

A etiologia da esclerose sistêmica é muito complexa e envolve fatores ambientais, genéticos e possivelmente aloreatividade, os quais vêm sendo estudados através das substâncias mediadoras entre as células, citocinas, endotelinas, integrinas e fatores mediadores de vasoconstrição e de inflamação (TAMBY et al., 2003). O acúmulo excessivo de colágeno na derme e tecido subcutâneo também foi demonstrado em pele aparentemente normal de pacientes com esclerodermia, sugerindo que a ativação dos fibroblastos é um evento generalizado, não restrito à área clinicamente acometida (OHTSUKA et al., 1990).

Numerosos estudos confirmaram uma produção aumentada de vários componentes do tecido conjuntivo, incluindo colágeno dos tipos I, III, VI e VII, fibronectina, decorina e glicosaminoglicanos em fibroblastos cultivados de pacientes com esclerodermia. O aumento da síntese biológica destas moléculas é acompanhado do aumento de seus RNAs mensageiros (KAHARI et al., 1984; KAHARI et al., 1987; PELTONEN et al., 1990; VUORIO et al., 1991; RUDNICKA et al., 1994).

Em adição à desregulação dos componentes fibróticos, ocorre ainda alteração das células inflamatórias com produção de auto-anticorpos pelos linfócitos B auto-reativos. Estudos realizados, em 1958, já descreviam LES, esclerodermia e dermatomiosite como manifestações de sensibilização contra proteínas que se ligam ao DNA. Ao conceito vigente do linfócito B produzir anticorpos e nas doenças auto-imunes muitos deles serem patogênicos, foram acrescentadas novas características que podem contribuir para o esclarecimento da auto-imunidade: esta célula está envolvida no

desenvolvimento da arquitetura linfóide, na ativação de células T e na regulação de subtipos de células T e células dendríticas, através da produção de citocinas (PORAKISHVILL et al., 2001). Evidências experimentais recentes sugerem que existem outros mecanismos de regulação da resposta auto-imune, além da via clássica de tolerância controlada pelos linfócitos CD4⁺ (Th1 e Th2). Novas hipóteses estão sendo propostas para a regulação fisiológica do mecanismo de sensibilização contra auto-antígenos. O mecanismo de “gatilho” pela exposição a auto-antígenos não é suficiente para explicar a cronicidade de muitas doenças auto-imunes, o que sugere a existência de uma desregulação central que mantém estes processos (BACH et al., 2001). O conhecimento das bases moleculares e a ação de alguns mediadores de atividade em fibroblastos vêm ajudando a elucidar e definir alguns alvos antigênicos e terapêuticos. Os mais importantes são o fator de transformação de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF). No modelo proposto, os dois fatores interagem entre si e, em nível celular, o TGF- $\beta 1$ inicia as alterações fibróticas que seriam mantidas pelo CTGF, levando ao excesso de produção da matriz extracelular (BLACK, 2001).

Um grupo de pesquisadores do Japão, em 1995, sugeriu com seus experimentos que células CD4⁺CD25⁺ contribuíam para manter a autotolerância pelo mecanismo de auto-regulação na ativação das células T (SAKAGUCHI et al., 1995). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que as células T, CD4⁺CD25⁺ são imunorreguladoras, impedindo doenças auto-imunes em órgãos específicos

(ASANO et al., 1996; ITOH et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2000; SALOMON et al., 2000).

Muitos auto-anticorpos são identificados nos soros de pacientes com esclerodermia. A presença de FAN nos pacientes com esclerodermia registrava uma incidência variada devido à falta de padronização do substrato celular empregado e as hipóteses para etiopatogenia já referiam a perda de tolerância imunológica dos portadores desta doença (McGIVEN et al., 1968). Após o uso de células HEp-2 como substrato para pesquisa de FAN pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), observou-se que 95% dos pacientes apresentam ao menos um auto-anticorpo (TAN et al., 1980; TAN, 1989). Alguns são específicos para esta doença, como o Scl-70 e anti-RNA polimerase I e III, que ocorrem na forma difusa da doença e o anticentromérico que ocorre na síndrome de CREST (calcinose, Raynaud, dismotilidade esofagiana, esclerodactilia e telangiectasia). Não se conhece ainda o papel patogênico destes auto-anticorpos nem qual o fator limitante que explique porque eles são excludentes, ou seja: quando um paciente tem um destes auto-anticorpos, os outros não se manifestam (TAN, 1989; ROTHFIELD, 1992; TAMBY et al., 2003). Os anti-RNA polimerase I/III estão associados com o envolvimento cutâneo difuso da ES (OKANO e MEDSGER, 1996). Alguns investigadores têm relatado uma incidência aumentada de auto-anticorpos em familiares de pacientes esclerodérmicos, com percentuais variando entre 12 a 58%, dependendo do método de investigação, da origem populacional e também da raça (TAKEHARA et al.

1985). Estes achados sugerem uma participação genética na patogênese desta doença.

2. OBJETIVOS

Com base no modelo experimental de esclerodermia induzida em coelhos pelo Col V, a presente pesquisa tem como objetivo:

- 1) Caracterizar a resposta imunológica dos animais, avaliando:**
 - a) níveis séricos de anticorpos antiCol V após a imunização;**
 - b) níveis séricos de complemento;**
 - c) presença de imunocomplexos circulantes;**
 - d) presença de fator reumatóide;**
 - e) reatividade a componentes intracelulares por imunofluorescência em células HEp-2;**
 - f) especificidade dos anticorpos contra componentes intracelulares;**
 - g) características físicas dos antígenos-alvo envolvidos.**

- 2) Analisar a eventual associação das alterações imunológicas encontradas com os processos de lesão tecidual observados nos animais imunizados.**

3. METODOLOGIA

Os procedimentos e as técnicas empregadas possibilitaram o desenvolvimento das etapas a seguir descritas.

3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

ANIMAIS

Foram utilizados coelhos da linhagem Nova Zelândia, fêmeas (N=10), com peso médio de 2.500g e dois meses de idade. Os animais foram inoculados com Col V humano comercial, utilizando o mesmo protocolo de TEODORO, 2001, conforme esquema anexo (FIGURA 6). Um grupo controle (N=10) foi inoculado com ACF. Foi estudado ainda um segundo grupo controle (n=6), imunizado com albumina (ALB) bovina no lugar do Col V. Os coelhos foram subdivididos em dois grupos, sacrificados nos períodos de 75 e 120 dias após o início da primeira imunização.

Os soros foram colhidos nos tempos ZERO, 30, 75 e 120 dias pós imunização para análise e estocados em alíquotas a -70°C até seu uso.

FIGURA 6: Protocolo da imunização dos coelhos; SC:subcutâneo; IM: intramuscular.

SOROTECA ADICIONAL

Foram analisados **66** soros de **61** coelhos pertencentes à soroteca do modelo experimental de imunização pelo Col V. Estes soros foram classificados em quatro grupos: normais (n=13); imunizados com ACF (n=19); imunizados com Col V humano comercial (Sigma Chem Co., St Louis, EUA) e ACF (n=14) e imunizados com Col V humano produzido no laboratório da Disciplina de Reumatologia (LIM 17) da Faculdade de Medicina da USP e ACF (n=15), conforme protocolo previamente estabelecido. Essas alíquotas de soro foram armazenadas a -20°C e testadas em ensaios imunológicos.

3.2. MÉTODOS

Os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de Imunologia Humoral da Disciplina de Reumatologia (LIM 17) da Faculdade de Medicina da USP. As leituras de todos os testes foram feitas de forma independente por dois examinadores, sem conhecimento da identidade dos soros em questão. Em caso de discordância, procedia-se à leitura conjunta a fim de se chegar a um consenso. Para cada auto-anticorpo pesquisado, foram incluídos soros positivos e negativos como controle.

Foram realizadas análises para a caracterização da resposta imune humoral tais como: pesquisa de anticorpos antiCols I, III e V, pesquisa de fator reumatóide (FR); dosagem do complemento total (CH100); pesquisa de imunocomplexos circulantes; detecção de FAN, caracterização da especificidade antigênica do FAN, caracterização de antígenos-alvo intracelulares pelas técnicas de immunoblotting.

ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPO ANTICOLÁGENO

Os anticorpos antiCols I, III e V foram avaliados através de método imunoenzimático (ELISA) em todas as amostras de soro dos coelhos, seguindo o protocolo descrito em TEODORO, 2001. Os soros foram considerados positivos quando apresentavam valores acima do *cut-off*, calculado a partir da soma da média proporcional dos soros controles normais (n=12) e três vezes o desvio padrão.

AGLUTINAÇÃO DE LÁTEX PARA DETECÇÃO DE FATOR REUMATOÍDE

Seguindo-se o princípio desta técnica, 25 μ L dos soros diluídos 1:20 em tampão glicina foram misturados numa lâmina de fundo escuro com o mesmo volume de reagente de partículas de látex revestidas com fração de imunoglobulina G (IgG) humana desnaturada. As amostras que apresentaram aglutinação visível foram consideradas reagentes e submetidas à prova semiquantitativa para determinação do seu título. Para tanto, os soros positivos à diluição inicial foram subsequentelemente testados em diluições seriadas, na razão de dois até a última diluição reativa. Os resultados foram expressos em unidades internacionais, seguindo orientação do fabricante que padronizou a primeira diluição (1:20) como correspondente a 25 UI/mL.

IMUNO-HEMÓLISE PARA DOSAGEM DO COMPLEMENTO TOTAL

A quantificação do CH100 foi realizada por ensaio de imuno-hemólise nas amostras de soro do protocolo experimental atual, as quais foram estocadas a -70°C e não descongeladas desde a sua obtenção. Inicialmente, preparava-se, sobre uma placa de plástico, gel de agarose a 2% em tampão GVB aquecido contendo uma suspensão a 6% de eritrócitos de carneiro sensibilizados com dose subaglutinante de hemolisina de coelho (1/75 no mesmo tampão). Após a solidificação da agarose nas placas, eram feitos orifícios neste gel, aos quais se aplicavam 10 μ L dos soros. Ao final de um

período de incubação de 12h a 4°C, seguido de 2h em estufa a 37°C, procedia-se à medição do diâmetro dos halos de hemólise. A padronização inicial desta técnica, utilizando-se uma mistura de soros frescos de coelhos normais, em diversas diluições, foi difícil, com reprodutibilidade duvidosa. Assim, optou-se pela comparação do diâmetro dos halos de hemólise nos soros de um mesmo animal em relação ao tempo ZERO de imunização, determinando-se um índice de variação de CH100 para cada animal.

ELISA PARA PESQUISA DE IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTE

Os níveis de imunocomplexos circulantes (ICC) foram determinados nos soros dos animais pelo método ELISA de captura, empregando anticorpo anti-C1q humano (Sigma Chem. Co., EUA). Para tanto, os orifícios das placas de ELISA foram sensibilizados com 50 µL de anticorpo anti-C1q humano diluído 1/600 em PBS, por 12 horas a 4°C, sendo em seguida bloqueada com soro fetal bovino (SFB) a 30% em PBS (100 µL/orifício). Os soros dos animais foram diluídos 1/20 em SFB a 30% em PBS e adicionados às placas sensibilizadas. Em cada ensaio incluía-se cinco diferentes concentrações (1000 a 62,5 µg/mL) de gamaglobulina humana (HuGG) agregada pelo calor (63°C por 30 minutos) como controle positivo. O teor protéico da fração HuGG foi determinado pelo método colorimétrico de Lowry (LOWRY, 1951). Os conjugados anti-IgG humana e anti-IgG de coelho, marcados com fosfatase alcalina (Sigma Chem. Co., EUA), foram utilizados, respectivamente, para a revelação da HuGG na curva humana e

nos soros de coelho. As incubações foram realizadas à temperatura ambiente, com períodos de uma hora para o bloqueio da placa; uma hora e meia para os soros e uma hora para o conjugado. As lavagens foram realizadas com PBS; a determinação das densidades ópticas (DO) foi realizada no leitor de ELISA a 405 nm e as absorbâncias para cada animal foram registradas e comparadas entre si. A análise dos soros de cada animal nos tempos zero, 30 dias, 75 dias e 120 dias após imunização foi feita na mesma placa para se evitar diferenças entre ensaios, utilizando-se somente as amostras mantidas no freezer a -70°C. Os resultados foram obtidos através da curva padrão construída em cada ensaio com os valores de DO correspondentes às diferentes concentrações da gamaglobulina humana e foram expressos em µg/mL.

IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES

Anticorpos contra antígenos intracelulares distribuídos no núcleo ou citoplasma celular ou FAN foram determinados pela técnica de IFI. Para tanto, foram utilizadas lâminas de microscopia contendo como substrato antigênico uma monocamada de células Hep-2, originadas de carcinoma epidermóide de faringe humana. As células foram cultivadas em garrafas de vidro com meio 199 (Instituto Adolfo Lutz, Brasil), suplementado com 10% de SFB, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após a confluência das células, estas eram retiradas pela adição de uma solução de tripsina 0,2% e Versene

0,02%, obtendo-se uma suspensão celular, a qual era transferida para uma placa de Petri contendo lâminas de microscópio. Passado o período de 24 h, as lâminas contendo as células aderidas eram cuidadosamente lavadas com solução de Hanks e, posteriormente, fixadas com acetona gelada e mantidas a -20°C até o uso.

Cada alíquota de soro (20µL), em diluição inicial de 1:80 em PBS, foi aplicada em campos delimitados das lâminas e incubada a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. A seguir, os soros foram aspirados, o excesso removido com jato de PBS e as lâminas colocadas em cuba de Coplin contendo PBS, e lavadas duas vezes sob agitação por 10 minutos. As células foram então incubadas com 20 µL de conjugado fluorescente anti-IgG de coelho, a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. Depois de repetido o procedimento de lavagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínula. Finalmente, procedeu-se à leitura em microscópio de fluorescência (Olympus BX 550), usando ocular com aumento de 10 vezes e objetiva com aumento de 40 vezes, totalizando um aumento de 400 vezes.

Foram consideradas reações positivas aquelas em que a intensidade de fluorescência era suficiente para se definir o padrão de fluorescência da área corada. O padrão de fluorescência nuclear ou citoplasmática foi caracterizado de acordo com o II Consenso Nacional de HEP-2 (DELLAVANCE et al., 2003).

Os soros positivos à diluição inicial foram subsequenteiramente testados em diluições seriadas, na razão de dois até a última diluição positiva.

Fotomicrografias foram obtidas em câmara fotográfica controlada por exposímetro automático Olympus PM-30.

Três soros de coelhos imunizados com Col V, obtidos após 75 dias de imunização e que apresentavam FAN em altos a moderados títulos, foram pré-incubados sucessivamente três vezes overnight com Col V humano (Sigma Chem. Co.) imobilizado em placas de poliestireno de 12 poços (COSTAR) na concentração de 5 µg/mL. Um soro de coelho injetado com ACF foi utilizado como controle e estudado da mesma forma. Posteriormente, esses soros foram testados nas células HEp-2 para avaliar eventual reatividade cruzada desses anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados. A interferência da absorção era definida quando o título do FAN apresentava uma diminuição correspondente a duas diluições. A eficiência do processo de absorção foi avaliada por ELISA em placas sensibilizadas com Col V humano. Num mesmo ensaio, as alterações da reatividade da amostra pré-absorvida com Col V eram comparadas com a reatividade original do soro sem tratamento prévio.

IMMUNOBLOT PARA DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS

Preparação dos substratos antigênicos:

Células epiteliais: Linhagens tumorais de carcinoma de laringe humana HEp-2 (American Type Culture Collection - ATCC) cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma) e de carcinoma de colo de útero, HeLa, cultivadas em meio 199, suplementadas com 10% de soro fetal bovino, foram mantidas

a 37°C e 5% de CO₂ até a confluência. A seguir, as células foram delicadamente destacadas da superfície plástica com o uso de uma lâmina de borracha, lavadas três vezes e ressuspensas em PBS.

Para a obtenção do extrato bruto salino, as células eram lisadas e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento rápidos, sendo sonicadas cinco vezes por 30 segundos, com intervalos de um minuto no sonicador Sonifier 250, graduação quatro, em banho de gelo. A proteólise era inibida pela adição de uma mistura de inibidores de proteases: PMSF 1 mM, aprotinina a um µg/mL, leupeptina um µg/mL e pepstatina a um µg/mL (concentração final). O material particulado residual era removido por centrifugação rápida e o sobrenadante, contendo o extrato solúvel, era estocado em alíquotas a -70°C até sua utilização.

Alternativamente, extratos celulares desprovidos de material nuclear e, portanto, enriquecidos da fração citoplasmática, eram obtidos como descrito em *Methods in Enzymology*, vol 182, seção IV, p.200-5, ed. M.P. Deutscher, Acad. Press, 1990. As células mantidas em cultura eram isoladas por centrifugação e ressuspensas com tampão hipotônico pH 7,9 contendo: HEPES 20mM, sacarose 70mM, KCl 420 mM, MgCl₂ 1,5mM, EDTA 0,2mM, DTT 0,5mM e PMSF 0,5mM. As células eram lisadas em homogeneizador de vidro tipo Dounce e o extrato bruto era submetido à centrifugação a 7.000 rpm por 15 min, em centrífuga refrigerada para remover células intactas, debris celulares e organelas maiores, núcleos intactos e mitocôndrias. O teor protéico do extrato, rico em fração citoplasmática, era determinado pelo método colorimétrico de Lowry (LOWRY, 1951) e, posteriormente, mantido a

-70°C em alíquotas, evitando-se o congelamento e descongelamento de uma mesma amostra.

Extrato salino de timo de bezerro: Foi usado o pó cetônico de timo de bezerro (Sigma Chem Co., St Louis, EUA) solubilizado em PBS, contendo bissulfito de sódio 15mM, na proporção de 1g:10mL. A homogeneização era feita sob agitação branda, a 4°C e por 6 horas. Em seguida, o material insolúvel era removido por centrifugação a 3.200 rpm, durante 30 minutos sob refrigeração. O sobrenadante coletado era concentrado 10 vezes a 4°C e estocado em alíquotas a -70°C, até o uso na técnica de *immunoblot* como fonte de antígeno.

Eletroforese em gel de poliacrilamida:

Amostras dos extratos totais e citoplasmáticos (100ug proteína/poço) eram submetidas à eletroforese em sistema descontínuo de pH, como descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970), usando gel de poliacrilamida a 7,5% sob condições desnaturantes e redutoras.

Para a determinação do peso molecular dos antígenos-alvo, 10 µL de uma mistura comercial de padrões de peso molecular eram aplicados no gel (β -galactosidase 116 kDa, albumina bovina 66 kDa, IgG humana 50 e 25 kDa). A eletroforese era realizada inicialmente a uma voltagem de 60 V e, quando a amostra atingia o gel de separação, a voltagem era aumentada para 100 V e mantida constante por um período de aproximadamente 2 horas. A corrida eletroforética era monitorada pelo corante azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, indicando a frente de corrida.

Transferência do gel para membrana de nitrocelulose:

A transferência das proteínas separadas por eletroforese do gel para a membrana de nitrocelulose era feita como descrito por Towbin (TOWBIN et al., 1979). A transferência ocorria a uma amperagem constante de 100 mA, por duas horas, a 4°C.

A eficácia da transferência era verificada corando-se a nitrocelulose com uma solução de Ponceau S.

Reação imunológica:

Após a transferência, a nitrocelulose era lavada com PBS até sair o excesso do corante (Ponceau S). Em seguida, a membrana era cortada em tiras verticais (0,4cm de largura) para imersão por uma hora, em canaletas, com tampão de bloqueio (PBS-Tween - leite desnatado a 5%), à temperatura ambiente.

Inicialmente, foi feita uma padronização da técnica com os soros de coelhos, usando extrato total de células Hela. Estes *immunoblot* foram extremamente ricos em bandas de variados pesos moleculares, o que dificultou a identificação e análise dos resultados obtidos. A diluição adequada para a otimização do ensaio foi definida em 1:100. Da mesma forma, a utilização de extratos de células HEp-2 enriquecidos de citoplasma, obtidos por centrifugação diferencial para remoção de núcleo, ofereceu resultados menos heterogêneos. As alíquotas de soros foram diluídas em tampão PBS contendo 10% de soro bovino adulto, 1% leite desnatado, 0.1% de Tween em TBS. Após este período, as tiras eram lavadas 3 vezes por 10

minutos, sob agitação lenta. Dando seguimento, era adicionado o conjugado imunoenzimático, anticorpo de cabra anti-IgG (cadeia H) de coelho, conjugado à fosfatase alcalina (Sigma Chem Co.), diluído 1:4.000 em tampão PBS -Tween-leite desnatado a 5%, por 30 minutos, à temperatura ambiente. A reação era desenvolvida pela adição de azul de nitrotetrazolium sal sódico (NBT) e bromo-cloro-indolil-fosfato (BCIP) em tampão de revelação (bicarbonato de sódio 0.84g, $MgCl_2$ 1 mM). Nos ensaios comparativos, foram incluídos soros de pacientes com doenças do tecido conjuntivo apresentando auto-anticorpos anti-Golgi (97 a 376 kDa) e anti-RNA polimerase I (12,5 a 210 kDa), gentilmente cedidos pelo Laboratório Fleury de São Paulo e anti-RNP (70 kDa e 33 kDa).

Interpretação:

Todos os ensaios incluíam soros humanos usados como referência e com especificidade antigênica estabelecida (anticorpo Scl-70, anti-RNP, antigolgina, anti- RNA polimerase I).

As bandas muito fracas, mal definidas ou aquelas presentes no controle normal foram interpretadas como reação inespecífica (*background*) e, por isso, desconsideradas. As bandas bem definidas e mais representativas, ou seja, de maior frequência no grupo de animais imunizados, tinham seu peso molecular estimado mediante construção de uma curva de calibração de peso molecular em escala monolog, através do cálculo de mobilidade eletroforética relativa (R_f) de cada banda encontrada. Para tal, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distância entre a banda e origem da corrida}}{\text{distância total da corrida}} \times 100$$

Teste de inibição:

Com o objetivo de verificar se as frações protéicas reconhecidas pelos soros de coelhos hiperimunes eram comuns àquelas reconhecidas pelos soros de pacientes anti-RNA pol I, foi realizado um teste de inibição, como se segue: na fase de *immunoblot*, as tiras de nitrocelulose eram pré-incubadas, respectivamente, com cada um desses soros humanos e, posteriormente, re-incubadas com o soro de um coelho Col V hiperimune representativo; a reação era revelada com o conjugado anti-IgG de coelho. O mesmo procedimento foi feito na ordem inversa dos soros, utilizando-se para sua revelação o conjugado imunoenzimático anti-IgG humana.

Purificação de anticorpos específicos anti-fração 175 kDa de células HeLa:

Os anticorpos mais representativos e reativos com proteínas de extratos citoplasmáticos de células HEp-2 (antiproteína com peso molecular 175 kDa), detectados pela técnica de *immunoblot*, foram eluídos em meio ácido e testados na imunofluorescência, conforme descrito por Smith & Fisher (1984). Para tanto, vinte membranas de nitrocelulose contendo proteínas de células HEp-2 fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, eram incubadas com o soro de um coelho representativo do grupo imunizado com Col V, conforme descrito acima. Prosseguindo, a região de reatividade era delimitada e a eluição dos anticorpos ligados à

membrana era feita com tampão glicina 0,2M contendo NaCl 150 mM, pH 2,8. Os eluatos obtidos eram rapidamente neutralizados com tampão TRIS 1M, pH 8,0 e concentrados 10 vezes contra polietileno glicol PM 8.000 e, finalmente, dialisados contra salina. Albumina bovina era adicionada na concentração final de 0.1%. A eficiência do processo de eluição dos anticorpos foi checada por *immunoblot* em extrato de células HeLa. Estes eluatos ácidos, contendo anticorpos purificados à fração protéica de alto peso molecular de células epiteliais HeLa/HEp-2, foram empregados em testes de *immunoblot* para avaliar possível reatividade cruzada com proteínas de timo de bezerro. Além disso, a reatividade desses eluatos foi também testada na IFI sobre células HEp-2 (SMITH & FISHER, 1984).

4. RESULTADOS

Os resultados envolvem soros provenientes da **soroteca** do modelo experimental (n=66) e soros dos 26 animais imunizados no **protocolo experimental atual** (n=91).

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTICOLÁGENOS

A padronização da técnica de ELISA foi realizada com 12 amostras de soros normais de coelho, seguindo a mesma linha da pesquisa iniciada por TEODORO, 2001. Os resultados da **soroteca** estão na TABELA 1.

TABELA 1: Frequência dos anticorpos antiCols I, III e V na Soroteca

Período Imunização	Anticolágenos		
	I	III	V
ACF (n=10)			
75 dias	0/3	0/3	0/3
120 dias	0/5	0/5	0/5
150 dias	0/2	0/2	0/2
ACF + Colágeno V Comercial (n=11)			
15 dias	0/4	2/4	0/4
30 dias	0/3	3/3	1/3
75 dias	0/4	4/4	3/4
ACF + Colágeno V LIM 17 (n=15)			
75 dias	4/5	4/5	4/5
120 dias	1/5	5/5	5/5
150 dias	5/5	5/5	5/5
Número de soros positivos/Número total de soros testados			

O antiCol I foi encontrado apenas nos animais imunizados com o Col V produzido no LIM-17. Destes animais, cinco foram estudados aos 75 dias e quatro foram reagentes (80%) para o Col I. No entanto, o soro de

outros quatro coelhos imunizados com o Col V comercial, examinados aos 75 dias, não apresentaram anticorpos reagentes ao Col I (TABELA 1).

Os animais imunizados com Col V comercial ou do LIM-17 responderam de forma semelhante ao Col III, com positividade próxima de 100% já a partir de 30 dias de imunização.

A positividade dos soros com 75 dias de imunização para o Col V é semelhante nos dois grupos de diferentes fontes de colágeno, onde temos três de quatro coelhos positivos (75%) para o antígeno comercial e quatro de cinco coelhos (80%) para o antígeno LIM-17. A análise da intensidade dessa reação para os anticorpos antiCols em cada soro positivo para os respectivos antígenos é expressa em números de desvios padrões (DP) acima da média e está ilustrada nas TABELAS 2 e 3 e nos GRÁFICOS 1 e 2. Apesar do número de soros positivos para o antígeno comercial ser pequeno, há uma tendência de aumento da intensidade da resposta imunológica para os antiCol III comparada ao antiCol V, relacionada com os dias de imunização, como se pode observar no GRÁFICO 1. Esta tendência não pôde ser observada nos coelhos imunizados com o antígeno produzido no LIM-17, possivelmente devido ao início do tempo de observação em 75 dias, quando a resposta imune já estava consolidada. (GRÁFICO 2).

TABELA 2: Níveis de anti-Cols III e V nos animais da Soroteca imunizados com colágeno V comercial

SORO	Dias imunização	Colágeno III	Colágeno V
1	15	3,2	nr
2	15	4,9	nr
3	30	9,0	nr
4	30	6,0	4,0
5	30	6,9	nr
6	75	12,6	5,9
7	75	7,3	9,0
8	75	11,9	8,5
9	75	12,5	nr

No. de Desvios Padrões acima da média; nr: não reagente; n = 9

GRÁFICO 1: Pesquisa de anticorpos antiCols III e V em soros de coelhos imunizados com Col V humano comercial. DP: desvio padrão; n=9.

TABELA 3: Níveis de anti-Cols I, III e V nos animais da Soroteca imunizados com colágeno V LIM-17

SORO	Dias imunização	Colágeno I	Colágeno III	Colágeno V
1	75	3,3	18,9	3,7
2	75	5,4	16,0	8,8
3	75	4,8	16,0	5,1
4	75	4,8	13,2	8,7
5	88	NR	14,7	NR
6	120	NR	9,8	15,8
7	120	2,4	9,1	14,6
8	120	NR	11,3	14,3
9	120	NR	11,4	11,6
10	120	NR	2,6	9,6
11	121	4,0	12,7	4,8
12	149	9,8	18,2	3,4
13	150	6,7	19,4	8,1
14	150	9,6	22,7	13,7
15	150	8,8	16,2	6,9
16	150	5,2	17,1	7,1
17	150	7,9	20,5	7,0
18	176	NR	17,1	6,5

No. de Desvios Padrões acima da média; nr: não reagente; n=18.

GRÁFICO 2: Pesquisa de anticorpos antiCols I, III e V em soros de coelhos imunizados com Col V humano LIM-17. DP: desvio padrão; n=18.

A mesma análise foi realizada com os soros do **protocolo atual** para verificar as alterações dos níveis de antiCols nos períodos de 30, 75 e 120 dias após imunização. Os resultados estão expressos na TABELA 4 e ilustrados no GRÁFICO 3. É importante ressaltar que nenhum dos animais imunizados com colágeno V comercial apresentou reatividade ao Col I, em nenhum tempo após a imunização. A reatividade ao Col III foi observada em 2/10 animais a partir de 30 dias de imunização e essa frequência aumentou para 100 % a partir de 75 dias. Em relação ao Col V, a reatividade foi consolidada em 100% dos animais, após 30 dias de imunização (GRÁFICO 4). Nestes gráficos estão demonstradas as respectivas médias dos números de desvios padrões para cada colágeno.

TABELA 4: Níveis de AntiCols III e V nos animais do protocolo experimental atual imunizados com colágeno V comercial

Coelho	Anticolágeno III			Anticolágeno V		
	30 dias	75 dias	120 dias	30 dias	75 dias	120 dias
1	4,4	7,1	3,8	37,2	34,6	16,4
2	nr	6	6,6	34,7	22,3	9,5
3	3,7	6,7	11	31,6	13	36,6
4	nr	5,1	14,8	19,9	9,1	27,4
5	nr	6,9	6,1	10,8	30,4	13,3
6	nr	5,6	nd	6,9	19,8	nd
7	nr	10,3	nd	31,3	15,1	nd
8	nr	11,2	nd	14,9	9,5	nd
9	nr	9,7	nd	11,1	41,8	nd
10	nr	11	nd	7,9	19,8	nd

No. de Desvios Padrões acima da média; nr: não reagente; nd: não disponível; n=10

GRÁFICO 3: Pesquisa de anticorpos antiCols III e V em soros de coelhos imunizados com colágeno V humano do protocolo experimental atual; DP: desvio padrão; n=42 soros de 10 coelhos.

GRÁFICO 4: Resposta ao antiCol V nos animais imunizados com Col V humano do protocolo experimental atual; DP: desvio padrão; Média de DP nos soros examinados aos 30, 75 e 120 dias de imunização; n=10 coelhos.

DETECÇÃO DE FATOR REUMATÓIDE

Dos 87 soros testados, verificou-se uma positividade de 4% para FR no grupo imunizado com Col V humano comercial. No entanto, uma positividade similar (3%) foi observada também no grupo controle que recebeu somente o ACF. Por outro lado, os 15 coelhos injetados com Col V humano produzido no LIM-17, apresentaram uma maior positividade (26,6%) de FR, registrando-se título alto, 100 UI/mL, em apenas um deles. Nos animais controles injetados com albumina bovina (n=6), somente um (16,6%) apresentou reatividade para o FR e em baixos títulos (TABELA 5).

TABELA 5: Frequência de fator reumatóide nos diferentes grupos de coelhos do modelo experimental

Grupos de Coelhos	Não Reagente	Reagente 50UI/mL	Reagente 100 UI/mL	% pos
	n (%)			
Normais (n=13)	13(100)	-	-	0
ACF (n=29)	28(96,5)	1(3,4)	-	3
ACF + Col V Hu comercial (n=24)	23(95,8)	1(4)	-	4
ACF + Col V Hu LIM 17 (n=15)	11(73,3)	3(20)	1(6,6)	26,6
ACF + Albumina (n=6)	5(83,3)	1(16,6)	-	16

DOSAGEM DE COMPLEMENTO TOTAL (CH 100)

A determinação da atividade hemolítica do complemento se restringiu às amostras de soros de animais do protocolo experimental atual por terem sido mantidas a -70°C e não descongeladas desde a sua obtenção. Os índices do CH100 foram calculados em relação ao valor inicial no tempo ZERO de cada animal, sendo posteriormente calculada a média de sua

variação em cada grupo (GRÁFICO 5). Os dez coelhos do grupo imunizados com Col V não apresentaram alterações significativas nos índices de CH100, durante todo o período experimental.

GRÁFICO 5: Níveis médios de CH100 nos três grupos de coelhos do protocolo experimental atual nos tempos ZERO, 30, 75 e 120 dias pós imunização. CV: Coeficiente de variação; n= 26 coelhos.

PESQUISA DE IMUNECOMPLEXOS CIRCULANTES

A pesquisa de ICC foi feita nas amostras de soro do protocolo experimental atual, as quais foram obtidas nos quatro tempos do protocolo. ICC ocorreu em 50% (5/10) dos soros dos animais imunizados com Col V humano ou com ALB (3/6), já nos primeiros 30 dias que se seguiram à imunização e em 80% aos 75 dias. O GRÁFICO 6 ilustra a variação dos níveis séricos de ICC desses dois grupos de animais. A análise dos níveis médios de ICC mostrou um maior aumento 75 dias após imunização, mantendo-se elevados até 120 dias no grupo Col V e voltando aos níveis

normais no grupo ALB. Em contraste, o grupo ACF não apresentou ICC no período avaliado.

GRÁFICO 6: Níveis médios de imunocomplexos circulantes nos três grupos de coelhos do protocolo experimental atual. DO: densidade óptica; n= 26 coelhos.

ANTICORPOS ANTINUCLEARES

Padrões de imunofluorescência:

A leitura dos padrões de IFI nos soros de coelho foi baseada nas definições do II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em células HEp-2 (DELLAVANCE et al., 2003). Foram utilizados 12 soros normais, que pertencem à **soroteca** do modelo, para se estabelecer a diluição de corte em 1/80. Dois dos soros normais apresentavam, ainda nessa diluição, uma coloração fraca residual definida como **PADRÃO 1** ou seja: **pontilhado nuclear discreto com marcação citoplasmática fibrilar linear corando as fibras do citoesqueleto das células HEp-2 mais fortemente ao redor da**

membrana nuclear e se prolongando por toda extensão do citoplasma. Além disso, esses soros apresentavam uma fraca reatividade do citoplasma das células em divisão com pequenos grãos ao redor da placa cromossômica negativa (FIGURA 7). Nos animais injetados com ACF, aos 75 dias, ocorreu uma intensificação do PADRÃO 1 com alguns soros (n=3/26) atingindo a diluição de 1/320 (FIGURA 8).

FIGURA 7: PADRÃO 1 de imunofluorescência em células HEp-2 observado com os soros de coelhos normais (400X).

FIGURA 8: Padrão tipo 1 de imunofluorescência em células HEp-2 observado com os soros de coelhos injetados com ACF (75 dias) (400X).

Os coelhos imunizados com Col V comercial apresentaram uma reação classificada de **PADRÃO 2**, que tem a mesma descrição do PADRÃO 1, **porém acrescido de pontos isolados citoplasmáticos intensamente corados, dispostos ao redor da membrana nuclear, muitas vezes de forma polarizada e lembrando o complexo de Golgi. Estes pontos permanecem no citoplasma das células em divisão com placa metafásica negativa** (FIGURAS 9 e 10).

Todos os animais imunizados com colágeno V LIM-17 apresentaram o PADRÃO 2 de imunofluorescência, porém a reação fibrilar citoplasmática foi mais intensa (FIGURA 11).

FIGURA 9: Padrão de imunofluorescência citoplasmático granular em células HEp-2 observado com os soros de coelhos imunizados com Col V humano comercial (75 dias) (400X).

FIGURA 10: Padrão de imunofluorescência em células HEp-2 com marcação citoplasmática granular e placa metafásica negativa observada com os soros de coelhos imunizados com Col V humano comercial (75 dias) (400X).

FIGURA 11: Padrão de imunofluorescência em células HEp-2 com marcação citoplasmática granular e placa metafásica negativa observada com os soros de coelhos imunizados com Col V humano LIM-17 (75 dias) (400X).

Eluatos ácidos contendo anticorpos purificados contra as fração protéicas de 175 kDa de células HeLa, obtidos a partir do soro de um coelho

hiperimune anti-Col V humano testados de forma comparativa com o soro original em célula HEp-2 de dois lotes diferentes. Os resultados foram aparentemente conflitantes, pois uma das lâminas reproduziu o PADRÃO 2 de imunofluorescência com o eluato. A outra lâmina foi negativa para anti-175 kDa .

Um terceiro padrão, **padrão anticentríolo**, foi identificado em alguns dos animais imunizados com Col V LIM-17 (FIGURA 12).

FIGURA 12: Padrão de imunofluorescência em células HEp-2 com marcação dos centríolos e placa metafásica negativa observada com os soros de coelhos imunizados com Col V humano LIM 17 (75 dias) (400X).

Nos coelhos imunizados com albumina bovina, observou-se um novo padrão de reação, o qual foi classificado, de acordo com o II Consenso de HEp-2 (DELLAVANCE et al., 2003), como padrão pontilhado fino denso nuclear (PFD) com mitose positiva (FIGURA 13).

FIGURA 13: Padrão de imunofluorescência em células HEP-2 com marcação nuclear com pontilhado fino denso e placa metafásica positiva observada com os soros de coelhos imunizados com albumina bovina (75 dias) (400X).

Frequência dos diferentes padrões de FAN:

Foram analisadas 66 amostras da soroteca adicional, sendo que 26 (34%) foram positivas para FAN com diluições maiores ou igual a 1/160. A TABELA 6 e o GRÁFICO 7 apresentam os resultados de FAN nos três diferentes grupos experimentais, por padrão de imunofluorescência. O PADRÃO 2 e o padrão ANTICENTRÍOLO foram exclusivamente detectados nos soros de coelhos imunizados com Col V. Além disso, o PADRÃO 2 esteve presente nesses animais, com elevada frequência (73%) e com altos títulos (título médio 1:320).

TABELA 6: Frequência dos padrões de imunofluorescência nos soros FAN reagente em títulos $\geq 1/160$ na soroteca adicional

Soros	Padrão 1	Padrão 2	Centríolo	%
Normais	3	-	-	11,5
ACF (75 dias)	4	-	-	15,3
Col V (75 dias)	0	19	3*	73,2
TOTAL	7	19	3*	100,0

n = 26; *Obs.: Soros com dois padrões.

GRÁFICO 7: Frequência dos padrões de FAN em soros da Soroteca adicional com títulos $\geq 1/160$; (n = 26)

A TABELA 7 e GRÁFICO 8 apresentam os resultados de FAN, por padrão de IFI, observados com os soros de 75 dias após imunização do protocolo experimental atual. Os resultados obtidos confirmaram a análise da soroteca anterior. De fato, o PADRÃO 2 de imunofluorescência foi exclusivo dos soros de coelhos imunizados com Col V humano, sendo detectado em 100% dos mesmos. Já o padrão anticentríolo ocorreu em

apenas um coelho do presente protocolo experimental e foi exclusivo do grupo imunizado com Col V.

TABELA 7: Frequência dos padrões de FAN nos soros do protocolo experimental atual, 75 dias pós-imunização, com títulos $\geq 1/160$

Soros	NR	Padrão 1	Padrão 2	Centríolo	PFD	Total
ACF	7	3	-	-	-	10
Albumina	1	-	-	-	5	6
Colágeno V	-	-	10	1*	-	10
TOTAL	8	3	10	1*	5	26

GRÁFICO 8: Frequência dos padrões de FAN nos soros do protocolo experimental atual, 75 dias pós-imunização, com títulos $\geq 1/160$; (n = 26).

Ampliando-se a análise da prevalência de anticorpos anticentríolo aos 86 animais do modelo experimental de esclerodermia, foi possível observar que apenas quatro animais (5%) imunizados com colágeno V humano comercial e/ou produzido no LIM-17 apresentaram este auto-anticorpo (TABELA 8, GRÁFICO 9). Os animais dos grupos que receberam albumina e/ou ACF foram negativos, independentemente do tempo de imunização.

TABELA 8: Frequência de anticorpos anticentríolo nos soros de coelhos normais, controles e imunizados

Grupos de animais	Anticentríolo	
	positivo	Negativo
Normais n=14	0	14
Albumina n=6	0	6
ACF n=29	0	29
Colágeno V n=37	4	33

n= 86 coelhos

GRÁFICO 9: Frequência de anticorpos anticentríolo nos soros de coelhos normais, controles e imunizados; n= 86 animais.

Avaliação da reatividade cruzada entre anticorpos antiCol V e FAN:

Com o objetivo de verificar se auto-anticorpos antinucleares encontrados pelo método de IFI em células HEp-2 nos soros de coelhos imunizados com Col V reagem cruzadamente com este colágeno, foi realizado um ensaio de adsorção de três soros hiperimunes que apresentavam uma reação na IFI classificada pelo nome **PADRÃO 2** (citoplasmático Golgi-*símile*). Os soros adsorvidos foram então retestados por IFI para pesquisa de FAN. Como controle, foi incluído um soro de coelho

injetado somente com ACF. Os resultados expressos na TABELA 9 e no GRÁFICO 10 mostram que a absorção dos anticorpos específicos com o Col V foi efetiva, porém, não interferiu na reação do FAN.

TABELA 9: Efeito da pré-adsorção com colágeno V humano na reatividade do FAN dos soros de coelhos hiperimunes.

Animal imunizado com Col V	Título do FAN	
	Antes da adsorção	Depois da adsorção
Soro 1	1/100	1/100
2	1/200	1/200
3	1/400	1/200
4 (ACF)	nr	nr

nr: não reagente

GRÁFICO 10: Teste da eficiência da pré-absorção dos anticorpos anti-Col V humano por ELISA; DO: densidade óptica.

DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS PELA TÉCNICA DE *IMMUNOBLOT*

Nos experimentos onde foram utilizados extratos de células epiteliais HEp-2 humanas, enriquecidos de citoplasma, foi bastante evidente uma reatividade comum a todos os soros de coelhos anti-Col V hiperimunes

obtidos a partir do 30º dia de imunização. Essa reatividade era específica a um grupo de frações protéicas de pesos moleculares altos, sendo mais evidentes aquelas com 175 kDa e outras com 220 kDa. Esse mesmo padrão de reatividade foi observado quando se utilizava extrato total de células HeLa como fonte de antígeno (FIGURA 14). É interessante mencionar que a intensidade da reatividade à fração de 175 kDa aumentou gradativamente com o tempo de imunização dos animais do grupo anti-Col V (FIGURA 14).

Com o objetivo de verificar a identidade da fração antigênica-alvo, foram comparadas as reatividades observadas com os soros de coelhos anti-Col V com aquelas de auto-anticorpos presentes no soro de pacientes com diferentes doenças do tecido conjuntivo. Para tanto, os ensaios foram realizados contra células epiteliais HeLa humanas e para efeito de comparação, incluídos soros com anticorpos específicos anti-Scl-70 (100 kDa e 200 kDa) (FIGURA 14), anti-RNA polimerase I (12,5 a 210 kDa) (FIGURA 15) e anti-Golgi (97 a 376 kDa) (FIGURA 16). A observação da FIGURA 16 denota que a reatividade dos soros de coelhos imunizados com colágeno V à fração protéica de peso molecular alto era comparável àquela dos soros anti-Golgi humano (Golgi-*símile*).

Quando as amostras de soro dos animais hiperimunes foram testadas frente a extrato de células linfóides (timo de bezerro), detectou-se reatividade extremamente forte a três frações protéicas de peso molecular, em torno de 160 kDa, 138 kDa e 125 kDa, respectivamente (FIGURA 17). Similarmente ao que ocorreu com o extrato de células Hep-2/HeLa, houve

um aumento gradativo da intensidade dessa reatividade nos soros dos animais anti-Col V ao extrato de timo.

Para avaliar se o padrão de reatividade ao timo correspondia àquele observado em células HEp-2, os eluatos ácidos contendo os anticorpos purificados anti-fração 175 kDa dessas células foram testados contra extrato de timo. Verifica-se, conforme a FIGURA 17, que não existe reatividade cruzada entre as frações identificadas nos extratos celulares epiteliais e no timo.

FIGURA 14: Padrão de reatividade de um coelho anti-Col V hiperimune em células HeLa humanas por *immunoblot*. Tiras: **a**: soro de coelho injetado com ACF 75 dias; **b, c, d, e**: soros de um coelho hiperimune obtidos nos tempos ZERO, 30, 75 e 120 dias pós-imunização; **f**: soro humano anti-Scl 70; **g**: soro de coelho imunizado com albumina bovina 75 dias.

FIGURA 15: Padrão de reatividade a células HeLa humanas por *immunoblot*. Tiras: **a e b**: soros humanos anti-RNA-polimerase I; **c**: soro de um coelho anti-Col V hiperimune 75 dias.

FIGURA 16: Padrão de reatividade a extrato enriquecido de citoplasma de HEp-2 por *immunoblot*. Tiras: **a** e **f**: coelhos normais; **b** e **d**: soros de coelhos anti-Col V hiperimunes 75 dias; **c** e **e**: dois soros humanos anti-Golgi; **g**: soro de coelho ACF 75 dias.

FIGURA 17: Comparação dos padrões de reatividade a extratos de timo de bezerro e de células HeLa por *immunoblot*. Tiras **a**: soro de coelho injetado com ACF 75 dias; **b**, **c**, **d**, **e**: soros de um coelho anti-Col V hiperimune obtidos nos tempos ZERO, 30, 75 e 120 dias pós-imunização; **f**: soro de um coelho anti-Col V hiperimune contra extrato citoplasmático de HeLa; **g**: soro de coelho imunizado com albumina bovina 75 dias; **h** e **i**: eluato da fração protéica 175 kDa contra timo e extrato total de HeLa, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O modelo animal de esclerodermia estabelecido pelo grupo de TEODORO, em 2001, a partir do processo de imunização de coelhos com Col V humano, é de grande validade para o conhecimento da fisiopatologia desta doença, como também pode contribuir para uma intervenção terapêutica mais adequada. As alterações teciduais dos animais imunizados, acometendo diversos órgãos, como pele, pulmão e rins, foram bem definidas (YOSHINARI et al., 2002; TEODORO, et al., 2003 e 2004) e se mostram com características morfológicas compatíveis com aquelas observadas nos pacientes esclerodérmicos.

A presente investigação sobre os aspectos imunológicos do modelo reforça sua potencialidade na compreensão desta patologia auto-imune em humanos.

É importante mencionar que as alterações teciduais observadas nos animais imunizados com Col V humano são progressivas e se desenvolvem quando anticorpos específicos são detectados no soro. A expressão dos Cols I, III e V nas artérias pulmonares já foi quantificada, mostrando remodelamento e um acúmulo crescente destes colágenos nas três camadas dos vasos, até 120 dias depois do início da imunização (PRIZON, 2003). Estudo realizado na sinóvia dos animais imunizados também revelou um remodelamento sinovial progressivo, caracterizado por aumento dos colágenos na íntima e subíntima com escasso processo inflamatório celular. O modelo reproduz alterações morfológicas sinoviais diferentes das

observadas nos modelos animais de AR, sendo semelhante aos encontrados na esclerodermia (OGIDO, 2005).

A detecção de anticorpos circulantes contra outros tipos de colágeno humano foi investigada, mostrando uma reatividade adicional aos Cols I e III. O aparecimento de antiCol III nos coelhos imunizados é precoce, sendo observada em 100% dos animais após 75 de imunização. O antiCol I não foi observado no modelo experimental atual, mas foi encontrado tardiamente com o antígeno Col V LIM-17 que parece ser mais imunogênico. Uma eventual reação cruzada do anticorpo anti-Col V não deve ser descartada, pois essas três moléculas são colágenos fibrilares. No entanto, é importante ressaltar que a molécula de Col V utilizada na sensibilização dos animais apresentava-se em sua forma nativa de tripla hélice que, comparativamente à forma molecular desnaturada (seqüência linear), produz pouca reação cruzada (LINSENMEYER et al., 1991). Apenas uma reação cruzada entre os Cols III e V não explicaria o aumento de resposta ao Col III encontrado nos soros com 75 dias. De fato, a cinética da resposta ao Col V foi distinta daquela observada ao Col III, pois os níveis de antiCol V se mostraram altos em 100% dos animais já a partir do trigésimo dia da imunização dos coelhos, enquanto anti-Col III era detectado somente em 20% dos animais no mesmo período. Da mesma forma, no 75º dia, observamos que não há uma correspondência entre os títulos de anti-Col V e anti-Col III.

Curiosamente, estes anticorpos contra colágenos são encontrados em pacientes com DDTC, especialmente na esclerodermia, havendo trabalhos que associam os mesmos com atividade clínica da enfermidade (UITTO et

al., 1979; MACKEL et al., 1982; JIMENEZ et al., 1986; COLONIA, 1998). A pesquisa de antiCols I e IV nos pacientes com ESP está associada a anormalidades da capacidade pulmonar, com fortes evidências de envolvimento na patogênese da doença (MACKEL et al., 1982). COLONIA, em 1998, demonstrou que: a frequência de anticorpos antiCol V é maior em ESP do que em LES, AR e DMTC; nas formas limitadas de ES ocorre uma associação de antiCol V com antiCol IV; na forma difusa, estes anticorpos vêm acompanhados de antiCol I; a presença de antiCol V tem relação com a atividade da doença no CREST e na forma difusa está associado à artralgia e hipergamaglobulinemia.

O princípio básico de imunização para uma obtenção satisfatória de anticorpos contra proteínas humanas em animais experimentais, com a utilização de adjuvantes para intensificar a resposta imune, já foi largamente estudado. A produção aumentada de anticorpos a antígenos protéicos incorporados em ACF é parcialmente devida a um efeito do depósito do antígeno, mas pode também ser consequência da resposta de hipersensibilidade do tipo tardio provocada por este material, uma vez que os linfócitos T, especificamente sensibilizados, poderiam induzir a um aumento na síntese de anticorpos através da cooperação linfocitária. As lesões inflamatórias locais geralmente são de pequena duração, embora possam tornar-se graves com vasculite e necrose cutânea se o antígeno for injetado novamente no mesmo sítio. Múltiplas injeções, em diferentes sítios, em um mesmo animal, causam uma doença crônica, com formação de complexos imunes pequenos que se depositam freqüentemente em

articulações, pequenas artérias renais e pulmonares. Este processo é reversível e termina quando a estimulação antigênica e os complexos são removidos (ABBAS et al., 2000). Deve-se considerar, ainda, que o adjuvante de Freund é mais eficaz em potencializar a resposta a antígenos timo dependentes, isto é, onde a cooperação é exigida para se obter uma resposta significativa (ROITT, 1973).

A reação de hipersensibilidade inicial em animais experimentais tem sua duração dependente da dose e especificidade protéica do antígeno injetado, bem como do tipo de adjuvante utilizado (ELLIS et al., 1992). Geralmente, o pico de ICC no soro ocorre na segunda semana após imunização, com consumo do complemento total hemolítico dose dependente. Após este período, o anticorpo produzido é encontrado livre no soro e os ICC desaparecem. As alterações do complemento são essenciais para uma indução eficiente da resposta imunológica inicial (ROITT et al., 1996). Neste modelo, os ICC ocorreram com maior intensidade aos 75 dias do início das imunizações; 15 dias após o terceiro reforço, sendo evidente a sua permanência nos animais imunizados com Col V até 120 dias. Essa permanência de ICC em detrimento da queda dos níveis de anticorpos anti-Col V no mesmo período poderia, em parte, ser justificada pelo desenvolvimento de uma resposta auto-imune nestes animais. Tais elementos não permitem definir a relevância dos ICC na patogênese das lesões teciduais, visto que este estudo não visou avaliar as alterações imunológicas no tecido, especialmente com a determinação de depósitos de imunoglobulinas e/ou componentes do complemento. Porém, a presença de

ICC nos animais imunizados não se mostrou associada ao consumo do complemento, sugerindo que é reduzida a sua participação na patogênese das alterações teciduais observadas. Sabe-se que os auto-anticorpos presentes na ES também não ativam a cascata do complemento. Além disso, existem relatos mostrando que os ICC podem estar presentes no soro dos pacientes com ES, porém, são escassas as evidências de sua deposição tecidual (KLIPPEL, 1997).

A presença de FR neste modelo experimental de ES não foi expressiva, sendo encontrado em baixos títulos, com positividade inferior a 30% dos animais imunizados. É interessante salientar que coelhos não desenvolvem artrite após imunização com Col II, ao contrário do observado em ratos que, além da artrite, produzem FR (STEFFEN & WICKS, 1971). A artrite em coelhos é obtida por meio de imunização prévia com albumina metilada e, após a sensibilização, injeta-se albumina metilada intra-articular, provocando uma artrite alérgica (HOWSON et al., 1986). Estes dados do modelo experimental são compatíveis com a ES, onde o FR é relatado na literatura numa incidência entre 10 a 30% dos casos, independente do tempo de doença e da severidade do quadro clínico (McGIVEN et al., 1968; BORGES, 2000).

A pesquisa de FAN em células HEp-2 foi totalmente caracterizada por uma resposta uniforme, persistente, forte e restrita aos coelhos imunizados com Col V humano, com o padrão citoplasmático apresentando o seguinte desenho: pontos isolados e intensamente corados, dispostos ao redor da membrana nuclear, muitas vezes de forma polarizada, sugerindo reatividade

contra o complexo de Golgi (PADRÃO 2); confirmação com títulos maiores que 1/160. Tais características não ocorreram em animais normais, imunizados com albumina ou controle ACF. A reatividade descrita como PADRÃO 1 (pontilhado nuclear discreto e citoplasmática fibrilar linear que cora as fibras do citoesqueleto das células Hep-2 ao redor da membrana nuclear e se prolonga por toda extensão do citoplasma) só aparece até a diluição 1/80, em alguns coelhos normais e imunizados com ACF. O grupo controle de albumina desenvolveu um padrão pontilhado fino denso, com títulos superiores a 1/80, que cora a placa metafásica nas células em divisão, descrito no II Consenso de HEp-2 como um padrão inespecífico em humanos, podendo ocorrer em indivíduos saudáveis, com doenças hepáticas, infecciosas bacterianas ou virais (DELLAVANCE et al., 2003). A presença de um padrão inespecífico de FAN no grupo controle de ALB sugere que esta proteína ligada a algum componente de ACF tornou-se imunogênica.

O anticorpo anticomplexo de Golgi (AAG) foi descrito pela primeira vez, em 1982, em um paciente com síndrome de Sjögren e linfoma (RENIER et al., 1994). É relatado na literatura como um anticorpo raro, encontrado após quadros virais e outras doenças reumáticas crônicas, sendo incomum no lúpus (BRADWELL et al., 1995; RENIER et al., 1994). Quando se apresenta em baixos títulos, pode não ter relevância clínica. A reatividade destes auto-anticorpos é variada, indicando grande diversidade de auto-antígenos, intitulados de golginas ou macrogloginas, com peso molecular variando entre 95 e 376 kDa (RENIER et al., 1996). Um dos auto-anticorpos reage com uma proteína de 230 kDa ligada à membrana periférica do

complexo de Golgi cuja função é desconhecida, mas parece estar envolvida na regulação dos movimentos de proteínas no aparelho de Golgi, em associação com os microtúbulos e a manutenção de suas estruturas (KOOY et al., 1994).

Ainda que a patogenia destes auto-anticorpos seja desconhecida, sabe-se que um anticorpo específico para uma organela citoplasmática tem importância no processamento, transporte e ordenação das proteínas recém-sintetizadas ou recicladas no espaço intracelular, favorecendo a movimentação de vesículas intracelulares entre o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e a membrana citoplasmática. O sinal que orienta este tráfico de proteínas não está totalmente esclarecido, mas os microtúbulos estruturais são um componente importante para estas funções. As proteínas residentes no complexo de Golgi e que desempenham a função de amparar estas novas proteínas, são chamadas de adaptinas, como a GTP (proteína triptofano guanosina) que fixa ADP e outras enzimas (NILSSON & WARTEN, 1994). AAG foi detectado em modelo animal de camundongos, após sete dias da injeção com vírus vivo *lactic dehydrogenase* (LDV). Apesar da falta de evidências do papel patogênico para este auto-anticorpo, pois não ocorreu reação cruzada com o anticorpo anti-LDV e os animais não apresentarem doenças auto-imunes, existe uma resposta com linfócitos B normais para um auto-antígeno (GROSSMANN e WEILAND, 1991).

Um grupo de pesquisadores da Suécia descreveu, em um artigo de revisão, um novo mecanismo de indução de auto-imunidade por vírus, em indivíduos imunocomprometidos que foram submetidos a transplante de

medula óssea e estavam infectados pelo citomegalovírus (CMV). Os pacientes produziram um auto-anticorpo contra a proteína de superfície celular CD13 (N-aminopeptidase), que também está presente no envelope do vírus. Após a internalização da partícula viral na célula, ocorre a sua incorporação em vesículas do complexo de Golgi. Referidos pacientes desenvolvem reação enxerto-hospedeiro crônica com lesões semelhantes à esclerodermia. Através desse modelo de mimetismo molecular, os autores propõem o tratamento da medula a ser transplantada com anticorpo anti-CD13, bloqueando a infecção por CMV e reduzindo a incidência de REHC (NAUCLER, 1996).

TARSOUNAS e colaboradores, em 1999, demonstraram que soros de pacientes com CREST continham um auto-anticorpo que reagia com componentes protéicos do complexo de Golgi e proteínas nucleares em espermatoócitos de camundongo. Os auto-antígenos apresentavam homologia com bovinos e humanos e estavam codificados no cromossomo 9 dos camundongos.

SEELIG e colaboradores descreveram um AAG em dois pacientes, um portador de Síndrome de Sjögren e o outro de esclerodermia (SEELIG et al., 1994 a). Este auto-antígeno foi inicialmente chamado de macrogolgina e posteriormente de giantina. É uma proteína residente no complexo de Golgi, com características de uma proteína secretora que é incorporada na membrana do retículo endoplasmático e transportada para vesículas do complexo de Golgi (SEELIG et al., 1994 b; LINSTEDT et al., 1995).

Em um total de 80 soros humanos contendo AAG, definidos por imunofluorescência indireta em HEp-2 e analisados por ELISA com auto-antígenos recombinantes e imunoprecipitação, 50% reagiram com a giantina. Soros com menor massa molecular reagiram com epítomos do fragmento carboxila-terminal da giantina na membrana proximal do complexo de Golgi e os de maior massa apresentaram maior reatividade nas porções amino-terminal e central do complexo. Devido à presença de um domínio transmembranário carboxila-terminal, a giantina é mais estável que as outras golginas, associando-se à face citoplasmática do complexo de Golgi, o que poderia contribuir para a sua auto-antigenicidade. Os autores postularam a hipótese de que auto-antígenos do complexo de Golgi são expostos erroneamente ao sistema imune no momento de lise celular (NOZAWA et al., 2004).

O padrão de anticentríolo é encontrado raramente em pacientes com doenças reumáticas não específicas e em algumas síndromes crônicas pós-viral, já tendo sido relatado no fenômeno de Raynaud, esclerodermia e hipertireoidismo. Quando em altos títulos é sugestivo de ES (DELLAVANCE et al., 2003). Este auto-anticorpo reage com a enolase dos neurônios, que se constitui em uma *heat shock protein* (BRADWELL et al., 1995). Seu antígeno é uma proteína de 48 kDa, que funciona como centro de organização dos microtúbulos, com importante função na organização do citoesqueleto das células em interfase e do aparelho mitótico nas células em divisão (MITCHISON & KIRSCHNER, 1984; KARSENTI et al., 1984). Durante o processo de desenvolvimento de oócitos de coelhos, estimulados com

pulsos eletromagnéticos numa fase anterior à mórula, com celularidade entre 8 e 32 células, aparece um material filamentoso denso que se agrega a uma pequena vesícula do complexo de Golgi, originando o centríolo (SZOLLÖSI & OZIL, 1991). Tais observações podem justificar o aparecimento simultâneo dos dois auto-anticorpos num mesmo animal, neste modelo experimental de esclerodermia.

O padrão anticentríolo foi descrito em coelhos normais, conforme dois trabalhos da Universidade de Toronto, indicando sua ocorrência em 10% dos animais examinados (CONNOLLY & KALNINS, 1978; TURKSEN et al., 1982). Os achados da presente pesquisa não confirmam esta afirmativa, pois em 86 animais desta casuística, os quatro coelhos que apresentaram este padrão pertencem ao grupo de imunização com o Col V, reforçando a observação da anormalidade que representa este anticorpo em coelhos. Uma hipótese possível para o achado registrado pela Universidade de Toronto é a presença de uma infecção subclínica no biotério.

Em humanos, o anticentríolo pode anteceder ESP e fenômenos de Raynaud (RATTNER, 1996) ou ser encontrado numa fase precoce da ES (SATO et al., 1994). Estudo realizado no Japão com 262 pacientes, onde 75 eram portadores de ES; 25 de fenômeno de Raynaud; 102 lúpicos; 30 com AR e 30 normais, este auto-anticorpo estava presente em apenas dois pacientes do sexo feminino (0,86%). Um dos casos sofria de ES há 13 anos e o outro apresentava fenômeno de Raynaud há dois anos (MOROI et al., 1983). Em 1986, OSBORN e colaboradores descreveram outro caso de anticentríolo com altos títulos em paciente com história clínica de Raynaud e

esclerodactilia há dois anos, sendo confirmada esclerose sistêmica progressiva. Um outro estudo, realizado em 106 pacientes com doenças dermatológicas, concluiu que quatro possuíam anticentríolo (3,8%), sendo três pacientes com ES e um com espectro esclerodérmico (TUFFANELLI et al., 1983).

CALARCO-GILLAM et al., em 1983, mencionaram um paciente com esclerodermia manifestando um anticorpo que reagia contra material pericentríolar denso, denominado de anti-PCM. Este soro foi estudado em substratos celulares de várias origens, em diversas fases da divisão celular e o anticorpo encontrado mostrou-se independente do anticentríolo. O anti-PCM foi posteriormente caracterizado com reatividades múltiplas de nove tipos antigênicos que não demonstraram associação com patologias auto-imunes. Sua presença está correlacionada com doenças neurológicas, muitas vezes infecciosas virais (MACK et al., 1998).

Outros auto-anticorpos citoplasmáticos já foram descritos em pacientes esclerodérmicos. SENÉCAL et al., em 1987, descobriram um auto-anticorpo citoplasmático em dois pacientes com diagnóstico recente de esclerose sistêmica, o qual reagia contra as proteínas dos microfilamentos de sítios de ancoragem (anti-MFAS) da membrana celular, distinto da actina e vinculina que são as duas maiores proteínas do citoesqueleto celular. Este auto-anticorpo é identificado no *immunoblotting* como proteínas de peso molecular de 53,5 kDa em extrato de células HEp-2.

Em 1991, MIYACHI et al., descobriram um outro auto-anticorpo, denominado como Anti-Wa, com 48 kDa, associado a proteína do tRNA, em

quatro de uma série de 130 pacientes (3%) com ESP, que não foi encontrado em nenhuma outra doença auto-imune. O substrato usado foi extrato de timo bovino e baço suíno.

A incidência dos auto-anticorpos em pacientes com ES é variável nos grupos populacionais estudados. Em japoneses, o anti-Scl-70 parece ter uma incidência maior em relação aos pacientes europeus e americanos e o padrão nucleolar do FAN é mais raro (IGARASHI et al., 1990). Por outro lado, o padrão citoplasmático em esclerodermia é incomum, com uma frequência de 3% em uma série de 735 pacientes, que foram classificados de acordo com o padrão de FAN em células HEp-2. Destes, 25% apresentavam padrão centromérico; 26% padrão homogêneo; 21% padrão pontilhado fino; 14% padrão pontilhado fino com nucleolar; 7% padrão pontilhado grosso e 3% com padrão nucleolar isolado (BUNN et al., 1998). Os autores não enunciaram o padrão citoplasmático encontrado.

O estudo de pré-adsorção com Col V humano nos soros de coelhos hiperimunes ao Col V, realizado com o objetivo de averiguar uma reação cruzada entre organelas citoplasmáticas da célula HEp-2 e este colágeno, demonstrou que o auto-anticorpo ACG tem reatividade independente do antiCol V. É interessante lembrar que a célula HEp-2 é de origem epitelial e não produz colágenos.

Os experimentos em *immunoblotting* com extratos de células epiteliais identificaram, nos soros de coelhos hiperimunes a Col V, duas frações protéicas com alto peso molecular, de 220 e 175 kDa, que aumentavam em intensidade com o tempo de imunização. As frações

protéicas dos extratos celulares distinguidas pelos soros dos coelhos imunizados com Col V humano estavam muito próximas daquelas reconhecidas pelos soros AAG humanos. Quando esses foram testados em extratos de células linfóides de timo, foi possível identificar a presença de anticorpos IgG contra três frações protéicas de pesos moleculares 160, 138 e 125 kDa. Essa reatividade contra o timo era bastante evidente e também se intensificava com o tempo de imunização.

O teste com eluato ácido dos anticorpos ligados à fração mais expressiva (175 kDa) dos extratos de células epiteliais contra extrato tímico demonstrou que não existe reatividade cruzada entre as frações encontradas nos extratos celulares epiteliais e linfóides. Assim, a análise do perfil de reatividade por *immunoblot* nos permite concluir que os coelhos imunizados com Col V produziram cinco auto-anticorpos bastante expressivos contra proteínas de alto peso molecular.

É provável que a fração de 175 kDa seja um dos antígenos-alvo dos anticorpos produzidos nos animais. Essa hipótese é justificada pela observação de que o eluato ácido, contendo os anticorpos específicos a esta fração antigênica, quando testados contra célula HEp-2 por IFI, reproduziu em uma das lâminas o padrão de anti-Golgi-*símile* dos soros originais. A aparente discrepância de resultados dos eluatos, na técnica de IFI, em duas lâminas comerciais de células HEp-2 pode ser justificada pelos diferentes métodos de fixação e conservação destas células pelos fabricantes. Sabe-se que estas preparações são recomendadas para uso sorológico e nos eluatos os anticorpos obtidos em meio ácido podem ter a sua reatividade

comprometida. Um outro fator a ser considerado é o baixo rendimento de anticorpos purificados inerente ao processo utilizado que permite a eluição de uma população de anticorpos com alto grau de pureza mas em baixa concentração, associado a pequenas alterações na expressão do antígeno-alvo dos diferentes substratos utilizados. Diante destes resultados, a análise por microscopia eletrônica em preparado de células seria mais conclusiva quanto a estrutura subcelular alvo dos auto-anticorpos produzidos nesses animais.

Os AAG são raros e quando descritos na literatura são mostrados em forma de relato de caso e sua presença não confirma ou exclui um diagnóstico. Em 1996, RENIER e colaboradores compilaram 30 casos individuais com AAG, onde um terço dos pacientes apresentava síndrome de Sjögren e o restante estava distribuído em diversas patologias: LES, AR, polimiosite, pênfigo bolhoso, ataxia cerebelar, degeneração cerebelar paraneoplásica, linfoma, adenocarcinoma, glomerulonefrites, hepatites e trombose venosa profunda. Alguns autores sugerem que sua presença é um sinal para indicar uma relação entre infecções virais e auto-imunidade (BLASCHEK et al., 1988; MOHAN et al., 1991).

Os AAG são heterogêneos e reagem com vários grupos de proteínas de pesos moleculares diversos. Uma macrogolgina foi identificada no soro de duas pacientes, uma com esclerodermia e síndrome de Sjögren e a outra com AR e síndrome de Sjögren. Os anticorpos eram idênticos e foram caracterizados e identificados como anti-giantina com peso molecular de 376 kDa, com uma prevalência de 9,2% em pacientes lúpicos; 37,5% em

pacientes com síndrome de Sjögren e em 11% de pacientes infectados com HIV (SEELIG et al., 1994a, b).

A giantina correspondeu a, aproximadamente, 50% dos anticorpos humanos de uma série de 80 soros com padrão de AAG em IFI. As outras frações reagentes têm 245, 160 e 95 kDa e, mais raramente, uma reatividade de 97 kDa. Entretanto, um terço destes soros não apresenta reatividade para estas cinco frações descritas, mas sim a outras de 220, 210 e 84 kDa. Outras duas reatividades são conhecidas, porém são extremamente raras: 115 e 67 kDa (NOZAWA et al., 2004). A descrição desse padrão de reatividade não abordou a possível correlação do anticorpo encontrado com a patologia ou manifestação clínica dos pacientes (NOZAWA et al., 2004).

Os coelhos da casuística em análise apresentaram uma reatividade a duas frações comuns à dos soros humanos: uma de 160 kDa, presente no extrato tímico e outra de 220 kDa, que é relatada na literatura como uma proteína associada às vesículas do complexo de Golgi, encontrada nos extratos de células epiteliais. A reatividade mais expressiva à proteína da célula HEp-2 de 175 kDa, revelada pelos soros de animais imunizados com Col V, não tem correspondente conhecido em soro humano.

A teoria proposta para justificar esta resposta ao Col V humano, em coelho, parece ter ocorrido em estágios. Admite-se que a agressão imunológica inicial ocorreu ao nível da camada endotelial dos vasos, pelo depósito de imunocomplexos constituídos de epítomos do Col V e respectivos anticorpos, causando processo inflamatório da íntima e lesão da

membrana basal, em decorrência do prolongado processo de imunização. Conseqüentemente, poderia ocorrer a perpetuação do dano vascular pela contínua exposição de antígenos autólogos do Col V, normalmente ocultos no interior das fibras heterotípicas, associados aos colágenos dos tipos I e III, localizados na junção da membrana basal e matriz extracelular. Os neo-antígenos assim expostos fomentariam a síntese de anticorpos (agora auto-anticorpos) dirigidos contra o Col V, contribuindo para a manutenção do processo inflamatório e dano tecidual. Auto-anticorpos poderiam estar igualmente dirigidos contra epítomos do Col tipo XI, que tem similaridade estrutural com o Col V e está presente na camada muscular das artérias e cartilagem articular. O remodelamento da matriz extracelular seria conseqüente à proliferação de fibroblastos e de células miofibroblásticas arteriais, em resposta à possível liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas, particularmente TGF-beta, potente indutor de fibrilogênese (BORDER et al, 1992; CZAJA et al, 1987).

Esta teoria baseia-se na proposta apresentada pelo grupo de estudo RAPIDS-1 (Randomized placebo-controlled study on prevention of ischemic digital ulcers scleroderma), constituído por diversos centros dos Estados Unidos, Canadá e Europa (KORN et al., 2004). As células endoteliais param de responder aos mediadores da vasodilatação, como as prostaciclina e o óxido nítrico, resultando numa resposta anormal aos mediadores da vasoconstrição, incluindo as catecolaminas. A excessiva produção de endotelina-1 (ET-1) estimularia a contração da musculatura vascular lisa, uma vez que é conhecida como o mais potente mediador da vasoconstrição

natural conhecido. A ET-1 fixa-se em receptores A e B das células endoteliais, musculares lisas dos vasos e fibroblastos. A ET-1 está diretamente ligada à gênese desta doença, associada com lesão vascular. Ela atua sobre os receptores da célula endotelial, estimulando a proliferação das células da musculatura lisa vascular e dos fibroblastos com depósitos de matriz extracelular. Outros estudos evidenciam a regulação negativa da produção de colágeno por citocinas antifibróticas como fator de necrose tumoral (TNF) alfa, assim com o interferon gama e a camptotecina, um inibidor. Estudos recentes associam o polimorfismo do TNF alfa com a presença de anticorpo anticentrômero e doença vascular pulmonar na ES (SATO et al., 2004).

Diante destes relatos da literatura, deve-se ficar atento à caracterização da resposta imunológica dos coelhos imunizados com Col V. De fato, é sabido que, apesar da diversidade protéica entre as espécies, a estrutura molecular do Col V é altamente preservada e que a eventual reatividade cruzada dos anticorpos antiCol com proteínas ou epítomos compartilhados, em várias moléculas do organismo, seria responsável pela resposta auto-imune encontrada neste modelo animal de esclerodermia. Os epítomos que geram auto-imunidade podem ser conformacionais, isto é, presentes apenas nas moléculas nativas, o que torna mais difícil as identificações protéicas pelas técnicas de *immunoblotting*, onde os trabalhos são desenvolvidos com antígenos desnaturados (MACKAY & ROWLEY, 2004). Estes auto-epítomos podem ser gerados no momento da morte celular, por necrose tecidual ou pelo mecanismo de apoptose, quando estas

moléculas são expostas ao sistema retículo endotelial que poderá iniciar uma resposta auto-imune. O fenômeno auto-imune da ES está relacionado à produção de substâncias reativas ao oxigênio no processo indutivo de isquemia e reperfusão tecidual (RODENBURG et al., 2000).

Os resultados desta pesquisa confirmam que o presente modelo experimental de DDTC, além de original, reveste-se de grande importância, pois reproduz alterações histológicas e imunológicas muito semelhantes à esclerodermia. O modelo é útil para tentar entender a patogênese destas enfermidades e, mais surpreendente, tentar elucidar como a inoculação de uma proteína da matriz extracelular, altamente conservada entre indivíduos e espécies, produz em organismo sadio uma enfermidade auto-imune, com uma resposta humoral estável a antígenos intracelulares que, na IFI, exhibe um padrão de FAN específico e com identificação de proteínas com peso molecular muito próximos dos encontrados nos pacientes com anticomplexo de Golgi.

6. CONCLUSÕES

A avaliação imunológica do modelo experimental de esclerodermia induzido por Col tipo V humano em coelhos, segundo os objetivos definidos para esta pesquisa, permitiu constatar a ocorrência dos seguintes fenômenos:

- ✓ Resposta imunológica aos Col tipo V e III humanos;
- ✓ Estabilidade dos níveis séricos do CH100 no decorrer da pesquisa;
- ✓ Permanência dos ICC na corrente sanguínea, por um período superior ao esperado, em uma imunização por hipersensibilidade para produção de soro hiperimune;
- ✓ Produção de auto-anticorpo anticomplexo de Golgi em 100% dos animais imunizados com Col V;
- ✓ Produção de auto-anticorpo anticentríolo em 10% desses animais;
- ✓ Anticorpo anticomplexo de Golgi nos animais anti-Col V reage a uma proteína de 175 kDa, que ainda não foi descrita em humanos;
- ✓ Produção de dois anticorpos contra frações protéicas semelhantes a anti-Golgi humano, que foram encontradas em duas pacientes com diagnóstico de ES: 220 e 160 kDa;

Destaca-se, ainda, que o FR é não reagente neste modelo experimental; os coelhos normais não desenvolvem anticentríolo ou antiGolgi.

ANEXOS

REAGENTES BIOLÓGICOS, SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS E
EQUIPAMENTOS:

Acetona (Merck, RJ)

Ácido acético glacial (Merck, RJ)

Ácido aminoacético-glicina (Labsynth, SP)

Ácido clorídrico (Merck, RJ)

Acrilamida (Sigma Chemical CO, St. Louis - MO)

Agarose-Type II-A (Merck, RJ)

Água destilada: obtida por destilação convencional e posterior passagem em aparelho Milli-Q plus (Milipore, SP)

Albumina bovina - BSA, 98-99% de albumina (Sigma, St. Louis - MO)

Anticolágeno tipo III (Oncogene)

Anticorpo anti-C1q (Sigma)

Anticorpo de cabra antimunoglobulina G humana conjugada a fluoresceína (Sigma, St. Louis - MO)

Azida sódica (Merck, RJ)

Azul de bromofenol (Merck, RJ)

Beta-2 mercaptoetanol (Sigma, St. Louis - MO)

Bicarbonato de sódio (Merck, RJ)

Bis-acrilamida (Sigma, St. Louis - MO)

Câmara de microfotografia (Olympus PM-30)

Carbonato de sódio anidro (Synth, SP)

Centrífuga para microtubos (Jouan, França)

Citrato 0,01 M pH 6,0 (Merck, RJ)

Cloreto de sódio (Merck, RJ)

Colágeno tipo I – pele bovina (Sigma)

Colágeno tipo III – placenta humana (Sigma)

Colágeno tipo V – placenta humana (Sigma)

Conjugado de estreptavidina-peroxidase (Gibco BRL, Gaithersburg - MD)

Coomassie Blue Brilliant (Serva, Heidelberg)

Cuba para eletroforese vertical (Permatron, SP)

Cuba para transferência (Permatron, SP)

Dodecil sulfato de sódio - SDS (Sigma, St. Louis - MO)

ECL: reagente de detecção por quimiluminescência para Western blotting
(Amersham, Buckinghamshire-England)

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético (Reagen, RJ)

Estufa de CO₂ (Forma Scientific, Ohio)

Etanol (Merck, R.J.)

Fluoreto de fenilmetilsulfonila - PMSF (Sigma, St. Louis - MO)

Filme diagnóstico T-Mat G/RA/ TMG/RA-1 (Kodak, SP)

Fixador (Kodak, SP)

Folha de acetato (3 M do Brasil, SP)

Fonte elétrica para eletroforese (Electrophoresis Power Supply EPS
500/400- Pharmacia, Suécia)

Fonte elétrica para transferência (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, CA)

Fosfato de sódio monobásico (Merck, RJ)

Fosfato de sódio bibásico (Merck, RJ)

Frascos de poliestireno estéreis (Corning, Cambridge-MA)

Glicerina (Merck, RJ)

Homogeneizador de tubos (Fanem, SP)

Leite desnatado em pó (Molico, Nestlé - SP)

Leupeptina (Sigma, St. Louis - MO)

Marcadores de peso molecular (MW-SDS-200 kit-Sigma, St. Louis-MO)

Mistura pré-corada com os seguintes marcadores de peso molecular:

Anidrase carbônica	29.000 Da
Ovalbumina	45.000 Da
Albumina humana	66.000 Da
Fosforilase B	97.400 Da
Beta-galactosidase	116.000 Da
Miosina	205.000 Da

Massa de modelar (Faber Castel, SP)

Meio de cultura de células - RPMI-1640 (Sigma, St. Louis-MO)

Membrana de nitrocellulose - Hybond ECL-TM (Amersham Life Science, Buckinghamshire- England)

Metanol (Merck, RJ)

Microscópio de fluorescência (Olympus BX 50)

Nonidet P-40 (Sigma, St. Louis-MO)

Papel de gráfico monolog

Persulfato de amônio (Merck, RJ)

Pepstatina (Sigma, St. Louis-MO)

Pipetas automáticas de 2, 20, 200 e 1.000 μ L (Gilson, França)

Polietilenoglicol 6.000- PEG (Reagen, RJ)

Ponceau S (Sigma, St. Louis-MO)

Reagente de látex para Fator Reumatóide (Laborclin - PR)

Revelador (Kodak, SP)

Sonicador (Sonifier 250, Branson - CT)

Soro fetal bovino (Sigma, St. Louis – MO)

TEMED (Sigma, St. Louis-MO)

Timo de bezerro (Sigma Chem Co., St Louis, EUA)

Tripsina 0,25% (Sigma T 7409)

Triton X-100 (Sigma, St. Louis-MO)

Triz-HCL (Sigma, St. Louis-MO)

Trizma (Sigma, St. Louis-MO)

Tween-20 (Sigma, St. Louis-MO)

Vaselina (Labsynth, SP)

SOLUÇÕES E TAMPÕES:

Solução Salina Tamponada (PBS)

Solução 20 vezes concentrada

Fosfato de sódio bibásico	47,7 g
Fosfato de sódio monobásico	6,44 g
Cloreto de sódio	174 g
Azida sódica	1,0 g
H ₂ O destilada qsp	1,0 L

Para uso, diluir 100 mL da solução em 1.900 mL de H₂O destilada, acertar para pH 7,2.

Tampão carbonato/ bicarbonato

[A] carbonato de sódio 2,12 g / 100 mL H₂O

[B] bicarbonato de sódio 1,68 g / 100 mL H₂O

Para 100 mL de tampão adicionar 32 mL da solução [A] em 68 mL de solução [B], ajustar para pH 9,6 e conservar a 4°C.

Tampão bloqueio Immunoblotting (PBS, Tween 0,05%, Leite desnatado 5%)

PBS pH 7,2 qsp 1000 mL

Tween 20 500 µL

Leite desnatado em pó Molico 50 g

Tampão PBS - Tween 0,05%- BSA 1%

PBS pH 7,2 qsp 1000 mL

BSA 10 g

Tween 20 500 µL

Gel de separação para eletroforese (15%)

Acrilamida 30% 2,50 mL

Bis-acrilamida 2% 0,22 mL

Tris 1M pH 8,7 1,87 mL

H₂O destilada 0,39 mL

SDS 20% 25 µL

TEMED 5 µL

Persulfato de amônio 10% 17µL

Gel de empilhamento para eletroforese

Acrilamida 30%	425 µL
Bis-acrilamida 2%	175 µL
Tris 1M pH 6,9	313 µL
H ₂ O destilada	1,58 mL
SDS 20%	12,5 µL
TEMED	6,25 µL
Persulfato de amônio 10%	12,5 µL

Tampão de corrida para eletroforese vertical

Solução 10 vezes concentrada pH 8,2

Trizma	242,2 g
Glicina	1.154 g
SDS	80 g
H ₂ O destilada qsp	8 L

Tampão de transferência para Immunoblotting

Solução 2 vezes concentrada

Trizma 1 M pH 8,25	100 mL
Glicina	57,6 g
Metanol	1,6 L
Azida sódica	0,4 g
H ₂ O destilada qsp	4,0 L

Tampão de Laemmli

Solução 4 vezes concentrada

SDS	4 g
-----	-----

2-mercaptoetano	4 mL
Glicerol	20 mL
Azul de bromofenol	10 µg
Trizma HCL pH 6,8 qsp	100 mL

Corante Ponceau S 5%

Ponceau S	500 mg
Ácido acético glacial	1 mL
H ₂ O destilada qsp	100 mL

Corante Comassie Blue - 0,2 %

Comassie blue brilliant	0,2 mL
Metanol	50mL
Ácido acético glacial	10mL
H ₂ O destilada	40mL

Descorante e fixador para gel de poliacrilamida

Metanol	600 mL
Ácido acético glacial	120 mL
H ₂ O destilada	600 mL

Tampão Glicina

Solução 20 vezes concentrada

Solução salina-glicina tamponada e concentrada contendo 0,1% de azida sódica como preservativo, que após diluição a 1:20 apresenta um pH final de 8,2. (Laborclin)

Tampão Veronal

Solução 5 vezes concentrada

Solução 1:

Cloreto de Sódio	41,90 g
Bicarbonato de Sódio	1,26 g
Barbital sódico	1,50 g
H ₂ O destilada aquecida	700 mL

Dissolver 2,3 g de ácido barbitúrico granular em 200 mL de água fervente, em seguida adicionar a solução 1 em constante agitação. Completar um litro com água destilada. Ajustar o pH entre 7,4 e 7,6. Estocar a solução a 4° C.

Solução Stock Metal

0,15M CaCl₂

1,0M Mg Cl₂

Misturar e estocar a 4° C.

Tampão GVB

Tampão Veronal (5x)	100,0 mL
Solução Stock Metal	0,5 mL
Gelatina	0,5 g
Completar para 500 mL	

DAB

70 mg de Diaminobenzidina Tetrahydrochloride

70 mL de PBS

3 mL de água oxigenada 10 volume.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. – **Cellular and molecular immunology**. 4.ed., USA, W. B. Saunders Company, 2000. p270-290.

ADACHI, E.; HAYASHI, T.; HASHIMOTO, P.H. - A comparison of the immunofluorescent localization of collagen types I, III and V with the distribution of reticular fibers on the same liver sections of the snow monkey (*Macaca fuscata*). **Cell Tissue Res.**, **264**: 1-8, 1991.

ADACHI, E.; HAYASHI, T. - Comparison of axial banding patterns in fibrils of type V collagen and type I collagen. **Collagen Relat. Res.**, **5**:27-38, 1987.

ANTES, U.; HEINZ, H. P.; LOOS, M. – Evidence for the presence of autoantibodies to the collagen-like portion of C1q in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, **31**:457-464, 1988.

ASANO, M.; TODA, M.; SAKAGUCHI, N.; SAKAGUCHI, S.. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. **J. Exp. Med.**, **184**:387-96, 1996.

BACH, J.F.. Non-Th2 regulatory T-Cell control of Th1 autoimmunity. **Scand. J. Immunol.**, **54**:21-9, 2001.

BLACK, C.M. – Scleroderma moves on. **Curr. Opin. Rheumatol.**, **13**:493-494, 2001.

BLASCHEK, M.A.; PENNEC, Y.L.; SIMITZIS, A.M.; LE GOLF, P.; LAMOUR, A.; KERDRAON, G.; JOUQUAN, J.; YOUINOU, P. – Anti-Golgi complex autoantibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. **Scand. J. Rheumatol.**, **17**:291-296, 1988.

BORDER, W.; RUOSLATHI, E. – Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. **J. Clin. Invest.**, **90**:1-10, 1992.

BORGES, C.T.L. – Esclerose sistêmica. In: Yoshinari, N.H.; Bonfá, E.S.D.O. – **Reumatologia para o clínico**. 1.ed. Ed. Roca, 2000; p.49-58.

BRADWELL, A.R.; STOKES, R.P.; JOHNSON, G.D. – **Atlas of HEp-2 patterns**. 1.ed. W. B. Saunders Company, 1995. p68.

BUNN, C.C.; DENTON, C.P.; SHI-WEN, X.; KNIGHT, C.;BLACK, C.M. – Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. **Br. J. Rheumatol.**, **37**:15-20, 1998.

CALARCO-GILLAM, P.D.; SIEBERT, M.C.; HUBBLE, R.; MITCHISON, T.; KIRSCHNER, M. – Centrosome development in early mouse embryos as

defined by an autoantibody against pericentriolar material. **Cell**, **35**:621-629, 1983.

CHUNG, E.; RHODES, K.; MILLER, E.J. - Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, **71**:1167-1174, 1976.

COLONIA, A.M.N. - Determinação do anti-colágeno V na esclerodermia. **Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 1998.

CONNOLLY, J.A.; KALNINS, V.I. – Visualization of centriolos and basal bodies by fluorescent staining with nonimmune rabbit sera. **J. Cell Biol.**, **79**:526-532, 1978.

CREMER, M.A.; ROSLONIEC, E.F. - The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. **J. Mol. Med.**, **76**: 275-288, 1998.

CRYSTAL, R.G.; WEST, J.B.; ET AL. - Structural organization of the pulmonary interstitium. In: Weibel ER, Crystal RG Philadelphia – Scientific Foundations Second Edition Lippincott – **Raven Publishers**, p.685-695, 1997.

CZAJA, M.; WEINNER, I.; EGHBALI, M.F. – Differential effects of gamma-interferon on collagen and fibronectin gene expression. **J. Clin. Invest.**, **90**:1-10, 1987.

DELLAVANCE, A.; GABRIEL, A.J.; CINTRA, A.F.U.; XIMENES, A.C.; NUCCITELLI, B.; TALIBERTI, B.H.; MOREIRA, C.; von MUHLEN, A.; BICHARA, C.D.; SANTOS, C.H.R.; YANO, C.M.; MANGUEIRA, C.L.P.; CARVALHO, D.G.; BONFÁ, E.S.D.O.; DOI, E.M.; GUIMARÃES, F.N.C.; ARAÚJO, F.I.; MUNDIM, H.M.; REGO, J.; VIEIRA, L.E.A.; POLI, O.; ANDRADE, L.E.C.; CALLADO, M.R.M.; MESQUITA, M.M.; SUGIYAMA, M.; SLHESARENKO, N.; SILVA, N.A.; CARBALLO, O.G.; LESER, P.G.; FRANCESCANTONIO, P.L.C.; JARACH, R.; XAVIER, R.M.; LEVY, R.A.; NEVES, S.P.F.; CRUVINEL, W.M.; SANTOS, W.S. - Il Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2 Definições para a padronização da pesquisa de auto-anticorpos contra constituintes do núcleo (FAN HEp-2), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico e suas associações clínicas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.43, 129-40, 2003.

DRAZEN, J.M.; GILL, G.N.; GRIGGS, R.C.; KOKKO, J.P.; MANDELL, G.L.; POWELL, D.W.; SCHAFER, A.I. – Musculoskeletal and connective tissue diseases. In: Rosenwasser, L.J. eds. **The vasculitic syndromes. Textbook of Medicine**. 21 ed. Philadelphia. Toronto. London & Sydney, 2000. p.1524-1527.

ELLIS, J.S.; CHAIN, B.M.; COOKE, A.; IBRAHIM, M.A.; KATZ, D.R. – Adjuvant composition determines the induction of type II collagen-induced arthritis. **Scand. J. Immunol.**, **36**:49-56, 1992.

ELSON, M.L. - Injectable collagen and autoimmune disease. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, **19**:165-168, 1993.

FESSLER, L.L.; BROSH, S.; FESSLER, J.H. – Tyrosine sulfation in precursors of collagen V. **J. Biol. Chem.**, **261**:5034-5040, 1986.

FICHARD, A.; KLEMAN, J.P.; RUGGIERO, F. - Another look at collagen V e XI molecules. **Matrix Biol.**, **14**: 515-531, 1995.

FREY, P.; LUTZ, N.; BERGER, D.; HERZOG, B. – Histological behavior of glutaraldehyde cross-linked bovine collagen injected into the human bladder for the treatment of vesicoureteral reflux. **J. Urol.**, **152**:632-635, 1994.

FUJI, K.; FUJIMOTO, W.; UEDA, M.; MAKINO, E.; ARATA, J. - Detection of antitype VII collagen antibody in Sjogren's syndrome/ lupus erythematosus overlap syndrome with transient bullous systemic lupus erythematosus. **Br. J. Dermatol.**, **139**(2):302-306, 1998.

GERSHWIN, M.E.; ABPLANALP, H.; CASTLES, J.J.; IKEDA, R.M.; van der WATER, J.; EKLUND, J.; HAYNES, D. – Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). **J. Exp. Med.**, **153**(6): 1640-1659, 1981.

GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. - Integrin Signaling. **Science**, **285**:1028-1032, 1999.

GROSSMANN, A.; WEILAND, E. – Immunization with inactivated lactate dehydrogenase-elevating virus followed by virus infection favors the selection of hybridomas synthesizing antibodies cross-reacting with intermediate filaments and the LVD envelope protein VP3. **Autoimmunity**, **8**:329-333, 1991.

GUOQIU, S. – Collagen autoantibodies. In: Peter, J. B.; Shoenfeld, Y. eds. **Autoantibodies**. New York, Elsevier, 1996. p. 185-194.

HAQUE, M.A.; MYZOBUCHI, T.; YASUFUKU, K.; FUJISAWA, T.; BRUTKIEWIEZ, R.R.; ZENG, Y.; WOODS, K.; SMITH, G.N.; CUMMINGS, O.W.; HEIDLER, K.M.; WILKES, D.S. - Evidence for immune responses to a self antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. **J. Immunol.**, **169**: 1542-49, 2002.

HATAKEYAMA, A.; KASTURI, K.N.; WOLF, I.; PHELPS, R.G.; BONA, C.A. – Correlation between the concentration of serum anti-topoisomerase I autoantibodies and histological and biochemical alterations in the skin of tight skin mice. – **Cell Immunol.**, **167**:135-140, 1996.

HAY, E.D. - Cell biology of extracellular matrix. **J. Cell Biol.**, **91**:205S-223S, 1981.

HAY, E.D. - Matriz assembly, In: **Cell biology of extracellular matrix**. New York, Plenum., 221-249, 1991.

HEYMER, B.; SPANEL, R.; HAFERKAMP, O. – Experimental models of arthritis. **Curr. Top. Pathol.**, **71**:123-152, 1982.

HOWSON, P.; SHEPARD, N.; MITCHELL, N. – The antigen-induced arthritis model: the relevance of the method of induction to its use as a model of human disease. **J. Rheumatol.**, **13**:379-390, 1986.

HYNES, R.O. - Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, **69**:11-25, 1992.

IAMAMURA, Y.; SCOTT, I.C.; GREENSPAN, D.S. - The Pro- α 3(V) Collagen Chain. **J Biol Chem**, **275**:8749-8759, 2000.

IGARASHI, A.; TAKEHARA, K.; SOMA, Y.; KIKUCHI, K.; ISHIBASHI, Y. – Clinical significance of antinuclear antibodies in japanese patients with systemic sclerosis. **Dermatologica**, **180**:136-140, 1990.

INKINEN, K.; TURAKAINEN, H.; WOLFF, H.; AHONEN, J. - Cloning of c DNA for rat Pro α 1(V) collagen m RNA. Expression Patterns of type I, type III

and type V collagen genes in experimental granulation tissue. **Connec. Tissue Research.**, **40**: 209-20, 1999.

ITOH, M.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, N.; KUNIYASU, Y.; SHIMIZU, J.; OTSUKA, F.; SAKAGUCHI, S.. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **J. Immunol.**, **162**:5317-5326, 1999.

JIMENEZ, S.A.; FELDMAN, G.; BASHEY, R. - Co-ordinate increase in the expression of type I and type III collagen genes in progressive systemic sclerosis fibroblasts. **Biochem. J.**, **237**:837-843, 1986.

KAHARI, V.M.; VUORIO, T.; NANTO-SALONEN. K. - Increased type I collagen mRNA levels in culture scleroderma fibroblasts. **Biochem. Biophys Acta**, **781**:183-86, 1984.

KAHARI, V.M.; HEINO, J.; LARJAVA, H. - Alterations in scleroderma fibroblast surface glycoproteins associated with increased collagens synthesis. **Acta Dermatol. Venereol.**, **67**: 199-205, 1987.

KARSENTI, E.; KOBAYASHI, S.; MITCHISON, T.; KIRSCHNER, M. – Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. **J. Cell Biol.**, **98**:1763-1776, 1984.

KLIPPEL, J.H. – **Primer on the rheumatic diseases**. 11.ed. Atlanta. Arthritis Foundation, 1997. p263- 272.

KNIGHT, B.; KATZ, D. R.; ISENBERG, D.A.; IBRAHIM, M.A.; LE PAGE, S.; HUTCHINGS, P.; SCHWARTZ, R.S.; COOKE, A. – Induction of adjuvant arthritis in mice. **Clin. Exp. Immunol.**, **90**:459-465, 1992.

KONOMI, H.; HAYASH, I. T.; NAKAYASU, K.; ARIMA, M. - Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. **Am. J. Pathol.**, **116**: 417-26, 1984.

KORN, J.H.; MAYES, M.; CERINIC, M.M.; RAINISIO, M.; POPE, J.; HACHULLA, E.; RICH, E.; CARPENTIER, P.; MOLITOR, J.; SEIBOLD, J.R.; HSU,V.; GUILLEVIN, L.; CHATTERJEE, S.; PETER, H.H.; COPPOCK, J.; HERRICK, A.; MERKEL, P.A.; SIMMS, R.; DENTON, C.P.; FURST, D.; NGUYEN, N.; GAITONDE, M.; BLACK, C. – Digital ulcers in systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, **50**:3985-3993, 2004.

KOOY, J.; TOH, B.; GLEESON, P.A. – Heterogeneity of human anti-Golgi auto-antibodies: reactivity with components from 35 to 260 kDa. **Immunol. Cell Biol.**, **72**:123-127, 1994.

LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-5, 1970.

LAWRENCE, R.; HARTMANN, D.J.; SONENSHEIN, G.E. – Transforming growth factor β 1 stimulates type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, **269**:9603-9609, 1994.

LINSENMAYER, T.F.; FITCH, M.J.; SCHMID, T.M.; BIRK, D.E.; BRUNS, R.R.; MAYNE, R. – Applications of anti-collagen monoclonal antibodies to studies of connective tissue structure and development. In: OLSEN B.R. & NIMINI M.E.: Collagen: biochemistry, biotechnology and molecular biology, Boca raton, 141-170, 1989.

LINSENMAYER, T.F.; GIBNEY, E.; IGOE, F.; GONDON, K.M.; FITCH, M.J.; FESSLER, B.E.D. – Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicker α 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. **J. Cell Biol.**, **121**:181-189, 1993.

LINSTEDT, A. D.; FOGUET, M.; RENZ, M.; SEELIG, H. P.; GLICK, B. S.; HAURI, H. P. – A C-terminally-anchored Golgi protein is inserted into the endoplasmatic reticulum and then transported to the Golgi apparatus. **J. Cell Biol.**, **92**: 5102-5105, 1995.

LOOS, M.; COLOMB, M. – C1, the first component of complement: structure-function-relationship of C1q and collectins (MBP-SP-A, SP-D, congluinin), C1-esterase (C1r and C1s and C1-inibitor) in health and diseases. **Behring Inst. Mitt.**, 1-5, 1993.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Bio. Chem.**, **193**:265-75, 1951.

MACK, G.J.; REES, J.; SANDBLOM, O.; BALCZON, R.; FRITZLER, M.J.; RATTNER, J.B. – Autoantibodies to a group of centrosomal proteins in human autoimmune sera reactive with the centrosome. **Arthritis Rheum.**, **41**:551-558, 1998.

MACKAY, I.R.; ROWLEY, M.J. – Autoimmune epitopes: autoepitopes. **Autoimmunity Reviews**, **3**:487-492, 2004.

MACKEL, A. M.; DELUSTRO, F.; HARPER, F.E.; LEROY, E.C. – Antibodies to collagen in scleroderma. **Arthritis Rheum.**, **25**:522-532, 1982.

MARES, D.C.; HEIDLER, K.M.; SMITH, G.N.; CUMMINGS, O.W.; HARRIS, E.R.; FOREMAN, B.H.; WILKES, D.S. - Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** **23**:62-70, 2000.

McGIVEN, A.R.; BOER, W.G.R.M.; BARNETT, A.J.; COVENTRY, D.A. – Autoantibodies in scleroderma. **Med. J. Austr.**, **2**:533-536, 1968.

MESTRIES, P.; ALEXAKIS, C.; PAPY-GARCIA, D.; DUCHESNAY, A.; BARRITAULT, D.; CARUELLE, J.P.; KERN, P. - Specific RGTA increases collagen V expression by cultured aortic smooth muscle cells via activation and protection of transforming growth factor- β 1. **Matrix Biology**, **20**:171-181, 2001.

MITCHISON, T.; KIRSCHNER, M. – Microtubule assembly nucleated isolated centrosomes. **Nature**, 312:(5991) 232-237, 1984.

MIYACHI, K.; TAKANO, S.; MIMORI, T.; YAMAGATA, H.; MITA, S.; MATSUOKA, Y.; IRIMAJIRI, S.; TANI, K.; AKIZUKI, M.; HOMMA, M. – A novel autoantibody reactive with a 48 kDa tRNA associated protein in patients with scleroderma. **J. Rheumatol.**, **18**:373-378, 1991.

MOHAN, T.C.; JALIL, H.A.; NADARAJAH, M.; SNG, E.H. – Four patients in Singapore with anti-Golgi antibodies. **Singapore Med. J.**, **32**:332-334, 1991.

MORELAND, L.W.; GAY, R.E.; GAY, S. - Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and systemic lupus erythematosus. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **60**: 412-418, 1991.

MOROI, Y.; MURATA, I.; TAKEUCHI, A. – Human centriole autoantibody in patients with scleroderma and Raynaud's phenomenon. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **29**:381-390, 1983.

MORROW, J.; NELSON, L.; WATTS, R.; ISENBERG, D. – **Autoimmune Rheumatic Disease**. Oxford, Oxford University Press, 1999, 277p.

MURYOI, T.; KASTURI, K.N.; KAFINA, M.J.; SAITOH, Y.; USUBA, O.; PERLISH, J.S.; FLEISCHMAJER, R.; BONA, C.A. – Self reactive repertoire of tight skin mouse: immunochemical and molecular characterization of anti-topoisomerase I autoantibodies. **Autoimmunity**, **9**:109-117, 1991.

NAUCLER, C.S.; LARSSON, S.; MOLLER, E. – A novel mechanism for virus-induced autoimmunity in humans. **Immunol. Rev.**, **152**:175-92, 1996.

NILSSON, T.; WARREN, G. – Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **6**:517-521, 1994.

NOZAWA, K.; FRITZLER, M.J.; VON MÜHLEN, C.A.; CHAN, E.K. – Giantin is the major Golgi autoantigen in human anti-Golgi complex sera. **Arthritis Res Ther.** **6(2)**: 95–102. 2004.

OGIDO, L.T.S. – Análise morfológica e bioquímica da sinóvia de coelhos imunizados com colágeno do tipo V. **Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2005.

OLIVEIRA, C.C. – Avaliação sequencial de pele de coelhos imunizados com colágeno do tipo V. **Monografia apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2005.

OHTSUKA, T.; KOIBUCHI, N.; SAKAI, H.; YAMAKAGE, A.; YAMAKAGE, S. - Quantitative analysis of $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(III)$ procollagen mRNA expression in systemic sclerosis skin tissue - an in situ hybridization study. **Arch. Dermatol. Res.**, **291**: 575-582, 1990.

OKANO, Y.; MEDSGER, T.A. – RNA polymerase I-III autoantibodies. In: Peter, J. B.; Shoenfeld, Y.: eds. **Autoantibodies**, 1.ed. New York, Elsevier, 1996. p. 727-734.

OSBORN, T.G., BAUERR, N.E., ROSS, S.C. – The tight skin mouse: physical and biochemical properties of the skin. **J. Rheumatol.**, **10**:793-796, 1983.

PELTONEN, J.; KAHARI, L.; UITTO, J.; JIMENEZ, S.A. - Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. **Arthritis and Rheum.**, **33**: 1829-1835, 1990.

PETTY, T.L.; RENNARD, S.I. - Lung elastin and matrix. **Chest**, **117(5):supl.1**, 229S-234S, 2000.

PORAKISHVILL, N.; MAGEED, R.; JAMIN, C.; PERS, O.; KULIKOVA, N.; RENAUDINEAU, Y.; LYDYARD, P.M.; YOUINOU, P. - Recent progress in the understanding of B-cell function in autoimmunity. **Scand. J. Immunol.**, **54**:30-38, 2001.

PRIZON, C.C. - Análise morfológica e padronização da cultura de miofibroblastos das artérias pulmonares em modelo experimental de doença difusa do tecido conjuntivo induzida pelo colágeno do tipo V. **Monografia apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2003.

PROCKOP, D.J. – Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annu. Rev. Biochem.**, **64**:403-434, 1995.

RATTNER, J. B.; FRITZLER, J. M. – Centriole and centrosome autoantibodies. In: Peter, J. B.; Shoenfeld, Y.: eds. **Autoantibodies**. 1.ed. New York, Elsevier, 1996. p. 153-160.

RENIER, G.; CARRERE, F.; CHEVALIER, A. – Les autoanticorps dirigés contre l'appareil de Golgi. **Rev. Med. Interne**, **15**:174-181, 1994.

RENIER, G.; FRITZLER, J. M.; CHEVALIER, A. – Golgi apparatus autoantibodies. In: Peter, J. B.; Shoenfeld, Y.: eds. **Autoantibodies**. 1.ed. New York, Elsevier, 1996. p. 325-330.

RIENTES, A.; DOLCHER, M.P.; PUCCTTI; BOMBARDIERI, S.; MIGLIORINI, P. – Anti-collagen antibodies in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. **Clin. Exp. Immunol.**, **102**:354-359, 1995.

RODENBURG, R.J.T.; RAATS, J.M.H.; PRUIJN, G.J.M.; van VENROOIJ, w.j. – Cell death: a trigger of autoimmunity ? **BioEssays**, **22**:627-636, 2000.

ROITT, I.M. – **Imunologia**. 1.ed., Rio de Janeiro, Livraria Atheneu S.A., 1973. p121-151.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. – **Immunology**. 4. ed., Barcelona, Mosby, 1998. p24.1 – 12.

ROTHFIELD, N.F. – Autoantibodies in scleroderma. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, **18**:483-498, 1992.

RUDNICKA, L.; VARGA, J.; CHISTIANO, A.M. - Elevated expression of type VII collagen in skin of patients with systemic sclerosis: Regulation by transforming growth factor- β . **J Clin. Invest.**, **93**: 1709-15, 1994.

RUZEC, M.C.; JHA, S.; LEDBETTRE, S.; RICHARDS, S.M.; GARMAN, R.D. – A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. **Arthritis and Rheum.**, **50**:1319-1331, 2004.

SAGE, H.; BORNSTEIN, P. - Characterization of a novel collagen chain in human placenta and its relation to AB collagen. **Biochemistry**, **18**:3815-3822, 1979.

SAITO, S.; KASTURI, K.; BONA, C. – Genetic and immunologic features associated with scleroderma-like syndrome of TSK mice. **Curr. Rheumat. Repots**, **1**:334-37, 1999.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SAKAGUCHI, N.; ITOH, M.; TODA, M.. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). **J. Immunol.**, **155**:1151-64, 1995.

SALOMON, B.; LENSCHOW, D.J.; RHEE, L.; ASHOURIAN, N.; SINGH, B.; SHARPE, A.; BLUESTONE, J.A. – B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4/CD25 immunoregulatory T cell that control autoimmune diabetes. **Immunity**, **12**:431-440, 2000.

SATO, S.; FUJIMOTO, M.; IHN, H.; TAKEHARA, K. – Antibodies to centrômero and centriole in scleroderma spectrum disorders. **Clin. Lab. Invest.**, **189**:23-26, 1994.

SATO, H.; LAGAN, A.L.; ALEXOPOULOU, C.; VASSILAKIS, D.A.; AHMAD, T.; PANTELIDIS, P.; VEERARAGHAVAN, S.; RENZONI, E.; DENTON, C.; BLACK, C.; WELLS, A.U.; BOIS, R.M.; WELSH, K.I. – The TNF-863A allele

strongly associates with anticentromere antibody positivity in scleroderma.

Arthritis and Rheum., **50**:558-564, 2004.

SEELIG, H.P.; SCHRANZ, P.; SCHROTER, H.; WIEMANN, C.; RENZ, M. – Macrogolgin – a new 376 kD Golgi complex outer membrane protein as target of antibodies in patients with rheumatic diseases and HIV infections. **J. Autoimmune.**, **7**:67-91, 1994.

SEELIG, H.P.; SCHRANZ, P.; SCHROTER, H.; WIEMANN, C.; GRIFFITHS, G.; RENZ, M. – Molecular genetic analyses of a 376 KDa Golgi complex membrane protein (giantin). **Mol. Cel. Biology**, **14**:2564-2576, 1994.

SENÉCAL, J. L.; FORTIN, S.; ROUSSIN, A.; JOYAL, F. – Anticytoskeletal autoantibody to microfilament anchorage sites recognizes novel focal contact proteins. **J. Clin. Invest.**, **80**:778-785, 1987.

SHIBATA, S.; MURYOI, T.; SAITOH, Y.; BRUMEANU, T.; BONA, C.A.; KASTURI, K.N. – Immunochemical and molecular characterization of anti-RNA polymerase I autoantibodies produced by tight skin mouse. **J. Clin. Invest.**, **92**:984-992, 1993.

SMITH, D.E.; FISHER, P.A. - Identification, developmental regulation, and response to heat shock protein of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: application of a improved

method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose blots. **J Cell Biol** **99**: 20, 1984.

STASTNY, P.; STEMBRIDGE, V.A.; ZIFF, M. – Homologous disease in the adult rat, a model for autoimmune disease: I. general features and cutaneous lesions. – **J. Exp. Med.**, **118**:635-648, 1963.

STEFFEN, C.; WICKS, G. – Delayer hypersensitivity reactions to collagen in rats with adjuvant-induced arthritis. **Z immunitats Allergieforsch**, **141**:169-80, 1971.

STEINO, A.; JORGENSEN, C.S.; LAURSEN, I.; HOUEN, G. – Interraction of C1q with the receptor calreticulin requires a conformational change in C1q. **Scand. J. Immunol.**, **59**:485-495, 2004.

SZOLLÖSI, D.; OZIL, J.P. – De novo formation of centrioles in parthenogenetically activated diploidized rabbit embryos. **Biol. Cell**, **72**:61-66, 1991.

TAKAHASHI, T.; TAGAMI, T.; YAMAZAKI, S.; UEDE, T.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, N.; MAK, T.W.; SAKAGUCHI, S.. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J. Exp. Med.**, **192(2)**:303-9, 2000.

TAKAI KK; HATTORI, S.; IRIE, S. - Type V collagen distribution in liver is reconstructed in coculture system of hepatocytes and stellate cells; the possible functions of type V collagen in liver under normal and pathological conditions. **Cell Structure and Function**, **26**:289-302, 2001.

TAKEHARA, K.; MOROI, Y.; ISHIBASHI, Y. – Antinuclear antibodies in the relatives of patients with systemic sclerosis. **Br. J. Dermatol.**, **112**:23-33, 1985.

TAMBY, M.C.; CHANSEAUD, Y.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L.. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, **2**:152-157, 2003.

TAN, E.M. - Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. **Adv. Immunol.**, **44**:95-151, 1989.

TAN, E.M.; RODNAN, G.P.; GARCIA, I.; MOROI, Y.; FRITZLER, M.J.; PEEBLES, C. – Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. **Arthritis and Rheum.**, **23**:617-625, 1980.

TARSOUNAS, M.; HENG, H.H.; YE, C.J.; PEARLMAN, R.E.; MOENS, P.B. – Identification of the mouse beta'-COP Golgi component as a spermatocyte autoantigen in scleroderma and mapping of its gene Copb2 to mouse chromosome 9. **Cytogenet Cell Genet.**, **87**:201-204, 1999.

TEODORO, W.R. - Imunogenicidade ao colágeno do tipo V em coelhos: um novo modelo experimental para o estudo da patogênese da vasculite de hipersensibilidade. **Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2001.

TEODORO, W.R.; MIRON, B. G.; OGIDO, L.T.I.; VELOSA, A.P.P.; ABATEPAULO, F.; CAPELOZZI, V.L.; YOSHINARI, N.H. – Synovial remodelling precess induced by type V collagen immunization in rabbits. **Pathol. Res. Pract.**, **199**:605-612, 2003.

TEODORO, W.R.; VELOSA, A.P.P.; WITZEL, S. S.; GARIPO, A. L.; FARHAT, C.; PARRA, E. R.; SONOHARA, S.; CAPELOZZI, V.L.; YOSHINARI, N.H. – Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. **Pathol. Res. Pract.**, **200**:681-691, 2004.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**, **76**:4350-4, 1979.

TUFFANELLI, D.L.; MCKEON, F.; KLEINSMITH, A.M.; BURNHAM, T.K.; KIRSCHNER, M. – Anticentromere and ant centriole antibodies in the scleroderma spectrum. **Arch. Dermatol.**, **119**:560-566, 1983.

TURKSEN, K.; AUBIN, J.E.; KALNINSV. I. – Identification of a centriole – associated protein by antibodies present in normal rabbit sera. **Nature**, **298**:673-765, 1982.

UITTO, J.; BAUER, E.A.; EISEN, A.Z. - Scleroderma: increased biosynthesis of triple-helical type I and III procollagens associated with unaltered expression of collagenase by skin fibroblasts in culture. **J. Clin. Invest.**, **37**:67-106, 1979.

van DER REST, M.; GARRONE, R. – Collagen family of proteins. **FASEBJ**, **5**:2814-2831, 1991.

von DER MARK, K.; von MENXEL, M.; WIEDEMANN, H. – Isolation and characterization of new collagens from chick cartilage. **Eur. J. Biochem.**, **124**:57-62, 1982.

VUORIO, T.; KAHARI, V.M.; BLACK, C.; - Expression of osteonectin, decorin and transforming growth factor β 1 genes in fibroblasts cultured from patients with systemic sclerosis and morphea. **J. Rheumatol.**, **28**:247-251, 1991.

WENER, M.H.; MANNIK, M.; SCHWARTZ, M.M.; LEWIS, E.J. – Relationship between renal pathology and size of circulation immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus. **Medicine**, **66**:85-97, 1987.

WENER, M.H.; MANNIK, M. – C1q autoantibodies. In: Peter, J. B.; Shoenfeld, Y.: eds. **Autoantibodies**. 1.ed. New York, Elsevier, 1996. p. 132-138.

YOSHINARI, N.H.; TEODORO, W.R.; OGIDO, L.T.I.; VELOSA, A.P.P.; PRIZON, C.C.; MIRON, B.; BISSOLI, J.C.C.; CUENTAS, E.R.P.; CAPELOZZI, V.L. - Modelo experimental de doença difusa do tecido conjuntivo (DDTC) induzido por colágeno tipo V. **Rev Bras Reumatol.**, **42(5)**:295-305, 2002.