LUCIANA TSUZUKI ICHICAWA OGIDO

**Análise morfológica e bioquímica da sinóvia de
coelhos imunizados com colágeno do 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

Ogido, Luciana Tsuzuki Ichicawa

Análise morfológica e bioquímica da sinóvia de coelhos imunizados com colágeno do tipo V / Luciana Tsuzuki Ichicawa Ogido. -- 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.SINOVITE/induzido quimicamente 4.COLÁGENOS FIBRILARES/análise

USP/FM/SBD-107/05

*Aos meus queridos pais Elisa e Paulino,
pela dedicação para que eu pudesse alcançar meus sonhos.*

Ao meu esposo Cesar e nossa filha Mariana,

os amores da minha vida.

Aos meus irmãos Sandra, Edgard e Paulo por sempre caminharmos juntos.

À minha sogra Fuzako pela sua solicitude e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari, mestre ímpar que com paciência, dedicação, apoio, orientou meu crescimento e caminho nesta tese.

À Dra. Walcy Rosolia Teodoro, que com a capacidade criadora dos grandes mestres pesquisadores co-orientou, e me incentivou em todos os momentos, com amizade e carinho.

À Mestre Ana Paula, amiga primorosa acima de tudo, que me mostrou todos os passos das técnicas laboratoriais, e da busca da perfeição em tudo o que faz.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Eloísa Silva Dutra Bonfá pela oportunidade na Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da USP.

À Prof^a. Dra. Vera Luiza Cappelozzi pela orientação valorosa para o estudo morfológico, pela disponibilidade em todas as horas, para a realização deste trabalho.

À Cristiane Carla de Oliveira pelo auxílio e amizade em todos os momentos nesta tese.

À Fátima Abatepaulo pela colaboração na confecção dos procedimentos histológicos.

Às secretárias da Disciplina de Reumatologia: Cláudia, Iná, Marta e em especial, à Fátima, pela ajuda em todos esses anos.

Ao Departamento de Patologia, setor de Técnicas Histológicas pela preparação dos materiais para análise morfológica e em especial, à Cássia Arruda pela boa vontade e prestatividade.

À todos que durante esta tese colaboraram na realização deste sonho.

ÍNDICE

	PÁG.
RESUMO	
SUMMARY	
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
1. Animais.....	29
2. Obtenção do Antígeno.....	29
2.1. Extração de colágeno do tipo V humano.....	29
2.1.1 "Westernblot".....	31
2.1.2 "Immunoblot".....	31
3. Protocolo Experimental.....	32
4. Coleta do tecido sinovial.....	33
5. Histologia.....	35
6. Imunofluorescência indireta.....	35
7.Extração e mapeamento bioquímico das cadeias dos colágenos I, III e V.....	36
7.1.Densitometria.....	38
7.2 Análise estatística.....	38

RESULTADOS.....	39
1. Resultados Morfológicos.....	39
1.1. Análise histológica.....	39
1.2. Imunofluorescência do colágeno.....	49
2. Resultados bioquímicos.....	55
2.1. Identificação dos colágenos I, III e V por “Immunoblot”	55
2.2. Mapeamento dos colágenos e resultados estatísticos	56
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

RESUMO

OGIDO LTI. *Análise morfológica e bioquímica da sinóvia de coelhos imunizados com colágeno do tipo V* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2005; 94p.

Desenvolveu-se no Laboratório de Investigação Médica do HC-FMUSP (LIM-17), modelo inédito de doença autoimune em coelhos saudáveis, imunizando-se os animais com colágeno do tipo V. Observaram-se alterações morfológicas em diferentes órgãos, sugerindo tratar-se de modelo experimental de doença difusa do tecido conjuntivo (DDTC), pois houve também o aparecimento de autoanticorpos nos soros destes animais. Embora a queixa articular seja aspecto comum nos pacientes com DDTC, existem diferenças morfológicas importantes na sinóvia destas diferentes enfermidades: na doença reumatóide observa-se intensa sinovite proliferativa, enquanto na esclerodermia predomina o remodelamento às custas do aumento da matriz extracelular. Assim, avaliou-se o padrão de comprometimento sinovial presente nos coelhos imunizados com colágeno do tipo V, com a suposição de que a análise morfológica e a pesquisa bioquímica dos colágenos presentes neste tecido pudessem contribuir na classificação do recém descoberto modelo de DDTC. Coelhas fêmeas da linhagem Nova Zelândia (N=10) foram imunizadas com duas doses de 1 mg de colágeno do tipo V associado a adjuvante de Freund, por via subcutânea com intervalo de 30 dias e duas outras inoculações foram acrescidas de adjuvante incompleto de Freund, com intervalo de 15 dias. Grupo controle de 10 animais recebeu apenas adjuvante. Após 75 e 120 dias do início da imunização, as sinóvias foram removidas para análise morfológica, bioquímica e imunohistoquímica. A análise morfológica mostrou importante acometimento vascular com proliferação da íntima, lesão da camada endotelial, obliteração do lúmen, além de escasso infiltrado inflamatório. Dados morfológicos e imunohistoquímicos revelaram presença de importante processo de remodelamento da matriz extracelular, às custas do aumento de depósito tecidual dos colágenos dos tipos I, III e V, confirmados pela análise densitométrica com aumento do colágeno do tipo I, III e V ($407,69 \pm 80,31$; $24,46 \pm 2,58$; $70,51 \pm 7,66$) comparados com o grupo controle ($164,91 \pm 15,67$; $12,89 \pm 1,05$; $32 \pm 3,57$) ($p < 0,0001$). Devido às particularidades do colágeno do tipo V, que é altamente imunogênico, está amplamente distribuído em diferentes tecidos, participa no mecanismo de fibrilogênese e encontra-se habitualmente oculto, postulou-se que o processo de imunização originou uma doença autoimune, pela exposição de epítomos ocultos desse permitindo assim, na perpetuação das lesões teciduais observadas neste modelo experimental. Concluímos que a análise dos dados histológicos e bioquímicos em sinóvia sinalizam para a descoberta de um modelo experimental inédito de esclerodermia, útil para compreender a patogênese desta DDTC, assim como auxiliar na elaboração de futuros projetos de pesquisa envolvendo drogas, que venham a beneficiar doentes com esclerose sistêmica.

SUMMARY

OGIDO LTI. *Morphological and biochemical analysis of the synovia of rabbits immunized with type V collagen* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo". 2005; 94p.

An original model of autoimmune disease in healthy rabbits was developed in the Laboratory of Medical Investigation (LIM-17), HC-FMUSP, by animals immunization with type V collagen. Morphological alterations were observed in different organs, suggesting that this is an experimental model of diffuse connective tissue diseases (DCTD) because autoantibodies were also observed in the serum of these animals. Articular complaints represent a common aspect in patients with DCTD, but important morphological differences exist in the synovia of these various illnesses. Intense proliferative synovitis was observed in rheumatoid disease, whereas remodeling with an increased in extracellular matrix predominates in scleroderma. Therefore, the present study evaluated the pattern of synovial impairment found in rabbits immunized with type V collagen based on the assumption that the morphological and biochemical analysis of collagens present in this tissue could contribute to the classification of the recently discovered model of DCTD. New Zealand female rabbits (N=10) were immunized with two doses of 1 mg collagen type V mixed with complete Freund's adjuvant, given subcutaneously with interval of 30 days, followed by two additional injections containing same amount of antigen and incomplete Freund's adjuvant. Control group animals (N=10) were inoculated only with adjuvant. After 75 and 120 days, the synovias were removed for morphological, biochemical and immunohistochemical analysis. Morphological analysis showed important vascular involvement with proliferation of the intima, damage to the endothelial layer and vascular lumen obliteration, in addition to a scarce inflammatory infiltrate. Morphological and immunohistochemical data revealed the presence of an important extracellular matrix remodeling process, caused by increased tissue deposition of collagen types I, III and V. The densitometric analysis confirmed these data, revealing increased amount of collagen type I, III and V ($407,69 \pm 80,31$; $24,46 \pm 2,58$; $70,51 \pm 7,66$) when compared with control group ($164,91 \pm 15,67$; $12,89 \pm 1,05$; $32 \pm 3,57$) ($p < 0,0001$). Based on the particularities of type V collagen, like its high immunogenic property, its wide distribution among different tissues, its participation on fibrillogenesis and the fact that this collagen is normally found hidden, we postulated that the immunization process, generated antibodies against this macromolecule, promoting autoimmune disease induced by type V collagen immunization. Continuous exposition of neoantigens probably contributed to the perpetuation of the tissue lesions observed in this experimental model. In conclusion, based on morphological and biochemical results, we signalize the discovery of the first experimental model of scleroderma, which might be useful in the understanding of the pathogenesis of this DCTD, and could helpful in the elaboration of future research projects involving drugs that could benefit patients with systemic sclerosis.

INTRODUÇÃO

Considerações gerais

Modelos experimentais em animais são utilizados para tentar esclarecer os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento das diferentes doenças reumatológicas, assim como para fornecer subsídios para possíveis intervenções terapêuticas destas enfermidades em humanos.

Entre esses modelos, a artrite induzida por colágeno (AIC) tem sido a mais estudada para o entendimento da patogênese e mecanismos imunológicos envolvidos no desencadeamento da artrite em animais susceptíveis como ratos, camundongos e primatas (COURTENAY and col. 1980; KLARESKOG and col, 1987). A imunização com colágeno tipo II tem sido a mais utilizada para o estudo da artrite reumatóide (AR), pois o modelo reproduz a sinovite com intenso processo inflamatório e formação de pannus, e erosões na cartilagem e osso subcondral, similares às alterações encontradas na AR humana (TRENTHAM et al, 1977; KEMPT et al, 1981). Outros tipos de colágeno como o IX e XI também têm mostrado propriedades imunogênicas e artritogênicas em modelos experimentais (CREMER, 1998).

Nas doenças reumatológicas, a importância da antigenicidade ao colágeno tem sido demonstrada através da identificação de anticorpos contra colágeno dos tipos I, II, IV e V nos soros de pacientes com doenças

difusas do tecido conjuntivo (DDTC). Sugere-se que anticorpos contra o colágeno dos tipos IV e V sejam responsáveis pela perpetuação da lesão vascular encontrada nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e vasculites (MORELAND et al,1991). Anticorpos contra o colágeno dos tipos I e IV também foram encontrados em pacientes com esclerodermia (MACKEL et al, 1982) e anticorpos contra o colágeno tipo VII em pacientes com Síndrome de Sjögren (FUJI et al 1998).

A antigenicidade ao colágeno foi demonstrada por Teodoro em 2001, que descreveu um modelo experimental original de vasculite de hipersensibilidade em pulmões de coelhos, após a imunização dos animais com adjuvante de Freund associado ao colágeno do tipo V humano. Os coelhos sacrificados após 75 e 120 dias do início da imunização apresentaram alterações morfológicas progressivas, especialmente em lobos basais pulmonares, caracterizadas morfolologicamente pelo espessamento da íntima vascular, depósito de colágeno em região subendotelial, perivascular, peribrônquica e interstício pulmonar, com infiltrado neutrofílico. Detectou-se também anticorpos anti-colágeno tipos I, III e V nos soros desses coelhos.

Posteriormente, YOSHINARI et al em 2002 demonstraram neste modelo que as alterações histológicas não estavam restritas ao tecido pulmonar, sendo visualizadas na pele, coração, esôfago, rim, sinóvia e cartilagem, e caracterizadas pelo comprometimento vascular, com espessamento da íntima e obliteração do lúmen do vaso, assim como o acúmulo de colágeno nesses órgãos, lembrando bastante as alterações

encontradas na esclerodermia e sugerindo a descoberta de um modelo experimental original para a pesquisa desta DDTC.

O colágeno do tipo V foi descoberto por CHUNG et. al (1976) na placenta humana, posteriormente na pele (SAGE E BORNSTEIN,1979), e em alguns locais na junção dermoepidérmica (FESSLER ET FESSLER, 1987). O colágeno V é do subgrupo fibrilar (FESSLER ET FESSLER, 1987, FICHARD ET AL 1995; VAN DER REST AND GARRONE, 1991) e pode se polimerizar *in vitro* para formar fibrilas finas com um padrão de bandas periódicas de 67 nm ou filamentos não estriados (ADACHI et al.,1989). Esses filamentos têm sido descritos *in vivo*, associados à região da membrana basal na epiderme, sugerindo uma função de ancoragem (FICHARD ET AL, 1995). No entanto, o colágeno do tipo V se localiza mais comumente em associação com o colágeno do tipo I e III, na forma de fibrila colágena. O colágeno do tipo V associado ao tipo I tem sido relatado principalmente na córnea (LINSENMEYER ET AL., 1993), e existem evidências de ligação cruzada entre esses dois colágenos (NIYIBIZI ET AL. 1994).

Dois modelos de localização e organização do colágeno tipo V tem sido propostos (FESSLER AND FESSLER,1987): um que considera que o colágeno do tipo V formaria um eixo central com fibrilas colágenas contendo primariamente colágeno do tipo I (VAN DER REST AND GARRONE,1991), e outro (LINSENMEYER ET AL,1993) que propõe um modelo em que as moléculas do colágeno tipo V e do tipo I ficariam interpostas, e o colágeno do tipo 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 1).

Figura 1: Em A, o colágeno do tipo V, entre as fibras do colágeno do tipo I. Em B, estrutura molecular do colágeno V (em vermelho), com sua porção aminoterminal se estendendo para a superfície. (LINSENMAYER ET AL,1993)

Postulou-se que as particularidades biológicas do colágeno tipo estariam envolvidas no desencadeamento das manifestações sistêmicas

observadas em coelhos saudáveis, imunizados com esta macromolécula associada ao adjuvante de Freund. O colágeno tipo V é uma proteína com propriedades singulares (MAYNE, 1993; NIYIBIZI, 1984). Na sua formação seus domínios terminais NH₂ e COOH, porções conhecidamente imunogênicas, são preservados, o que a torna bastante imunogênica (ADACHI et al, 1997; HAY, 1991) (Fig.2). Apesar de presente proporcionalmente em menor quantidade nos diferentes tecidos, o colágeno do tipo V tem ampla distribuição, e normalmente forma fibras heterotípicas juntamente com os colágenos I e III, e em condições fisiológicas normais, encontra-se oculto (MIZUNO et al 2001; KONOMI et al, 1984; LAWRENCE et al, 1994; LINSSEN et al, 1990).

Figura 2: Modelo de estrutura molecular do colágeno

Sugeriu-se inicialmente, que no modelo experimental com inoculação do colágeno do tipo V em coelhos (TEODORO, 2001) haveria formação de imunecomplexos, que ao se depositarem na parede dos vasos, desencadeariam o processo inflamatório. Isto culminaria com a lesão do endotélio e membrana basal, e exposição de epítomos ocultos do colágeno do tipo V, presente logo abaixo da membrana basal, possivelmente em consequência do processo inflamatório local. A exposição de neoantígenos contribuiria para a perpetuação do processo imunológico, instalando-se um modelo experimental de autoimunidade, perpetuada pela contínua re-exposição de epítomos do colágeno V, e consequente estímulo para produção dos correspondentes autoanticorpos.

Diferentemente de outras espécies susceptíveis, a literatura registra que o coelho não desenvolve artrite experimental, em resposta ao uso isolado de adjuvante de Freund (completo/incompleto), ou mesmo quando associado ao colágeno do tipo II. Descreve-se modelo de artrite localizada induzida em coelhos, ao se injetar antígeno protéico solúvel (classicamente a albumina bovina metilada) no joelho do animal, previamente sensibilizado por via sistêmica com este antígeno associado com adjuvante completo de Freund. A artrite confinada à articulação injetada com albumina é de desenvolvimento precoce, e semelhante à observada na AR, com infiltrado constituído de linfócitos T (preferencialmente CD4+), linfócitos B, mastócitos e macrófagos, e acredita-se que a patogênese esteja ligada à formação de imunecomplexos (HOWSON, 1986).

Assim, imunização de coelhos com colágeno do tipo V reveste-se de grande importância médica, pois este modelo original reproduz alterações morfológicas observadas em DDTC, e promove alterações sistêmicas, o que permite estudar em detalhes, o envolvimento dos diferentes órgãos.

Neste trabalho, propusemos estudar o envolvimento do tecido sinovial após sensibilização com colágeno do tipo V, pois análises preliminares sugeriram tratar-se de sinovite diferente da observada na artrite reumatóide, razão pela qual, se esta proposição estiver correta, poderia contribuir no conhecimento fisiopatológico da artrite encontrada, em outras patologias como por exemplo, no lúpus eritematoso sistêmico e esclerodermia.

Pesquisamos as alterações histológicas encontradas nas sinóvias de animais inoculados com colágeno tipo V comparados com controle, após 75 e 120 dias de imunização, e estudamos o remodelamento da matriz sinovial, realizando a imunolocalização de colágeno dos tipos I, III e V, por imunofluorescência indireta, e análise semiquantitativa destes colágenos, inicialmente fracionados através da eletroforese em gel de poliacrilamida, e posteriormente submetidos à análise densitométrica.

Estrutura e função da sinóvia

Apesar de representar menos que 1/10000 da massa corporal de um indivíduo adulto, a sinóvia tem funções especializadas como a produção de componentes da matriz extracelular e de líquido sinovial, interação com os elementos da resposta imune (incluindo complexo Ag-Ac, proteínas do complemento e linfócitos B), e é alvo de doenças inflamatórias capazes de produzir intensa incapacidade física.

Ela não é uma membrana verdadeira, mas um espaço tecidual modificado, formada pelas células de revestimento da superfície e a matriz especializada, conhecida como íntima; e a subíntima, localizada na porção subjacente, que é rica em componentes vasculares. A íntima está associada a uma matriz fibrilar fina ou amorfa com fibras colágenas ausentes ou intermitentes. Logo abaixo desta existe uma camada relativamente rica em colágeno, bastante distensível, que forma a base da membrana física. E abaixo desta, existe uma camada frouxa que fica junto aos ligamentos, tendões, periósteo ou outras estruturas fibrosas, e que permite a membrana movimentar-se livremente (WALSH et al, 1997) (Fig. 3).

Figura 3: Sinóvia normal hematoxilina-eosina 200x

Os sinoviócitos da íntima estão normalmente organizados em uma fina camada de 1 a 3 células de aspecto cubóide e basofílico, embebidos em uma substância fundamental, sem a presença da membrana basal.

Segundo a classificação proposta por KEY (1932), existem três tipos diferentes de sinóvia: a fibrosa, areolar e adiposa, com base na estrutura da subíntima. A sinóvia areolar é a forma mais especializada, distensível, podendo se dobrar e algumas vezes apresenta projeções ou vilosidades. Uma camada mais ou menos descontínua de 1 a 2 células repousa sobre a superfície e logo abaixo dessas células estão os capilares. Mais profundamente há um plexo de pequenas vênulas onde são encontrados também mastócitos. As fibras nervosas estão presentes principalmente em associação com os vasos sanguíneos.

A sinóvia adiposa tem rico depósito de gordura e também pode apresentar vilosidades, e como os outros tipos, tem uma camada de células na íntima e uma rede superficial de capilares com mastócitos. A íntima pode

repousar diretamente sobre os adipócitos, mas geralmente está associada com uma fina banda de substrato rico em colágeno particularmente no caso dos vilos. Na região mais profunda do tecido está a gordura, em quantidade variável, que tende a diminuir com a idade, com aumento relativo do tecido fibroso. Os vilos geralmente têm uma arteríola central e vênulas; os menores podem ser avasculares.

A sinóvia fibrosa é rica em tecido fibroso, semelhante ao substrato existente em ligamentos ou tendões, em que repousa uma camada de células de distribuição intermitente e variável, com uma quantidade de vasos sanguíneos também variável. A sinóvia fibrosa pode ser mais difícil de se diferenciar da fibrocartilagem, especialmente em algumas localizações como nas articulações dos dedos das mãos (Fig. 4).

Figura 4: Tipos de sinóvia (adaptado, Klippel, 1998)

Uma rica rede vascular está presente abaixo da superfície da sinóvia normal, provendo um alto fluxo sangüíneo necessário para a troca de solutos e gases, não só para a sinóvia, mas também para a cartilagem articular avascular. A vasculatura sinovial é essencial para formação de líquido sinovial, comporta-se como um órgão endócrino, gerando fatores que regulam a função dos sinoviócitos, e é uma porta de entrada seletiva, recrutando células inflamatórias da circulação quando necessário. Além disso, o fluxo sangüíneo regula a temperatura intra-articular, que normalmente é mais baixa que a temperatura corporal. Movimentos ativos, sem suporte de peso, aumentam a temperatura intra-articular em mais de 1°C, provavelmente pelo aumento do fluxo sangüíneo local.

Os capilares estão presentes em estreita proximidade aos sinoviócitos e podem repousar sob a íntima. Estes capilares parecem ser particularmente proeminentes na sinóvia normal de crianças e sugere-se que o seu número diminua com o aumento da idade. Aproximadamente 200 µm abaixo da superfície são encontradas vênulas maiores, em associação com arteríolas e linfáticos.

A rede arterial e venosa da articulação é complexa, mostra grande plasticidade, e é caracterizada pela rica anastomose arteriovenosa. As artérias sinoviais se ramificam até chegar à subsinóvia e formam as chamadas unidades microvasculares. A sinóvia que reveste a superfície dos ligamentos intra-articulares e as ênteses (no ângulo de inserção óssea) são particularmente bem vascularizados. Na artrite inflamatória observa-se intensa angiogênese. Contrariamente, a imobilização em modelos animais,

diminui o número de plexos capilares, bem como o fluxo sangüíneo nas articulações.

Linfáticos podem ser demonstrados na sinóvia normal por técnicas de injeção de contraste e por imunofluorescência dupla. Vasos com características de coloração de linfáticos são difíceis de se encontrar na sinóvia reumatóide, sugerindo que pequenos vasos linfáticos sejam destruídos por processo inflamatório, ou mudança na composição bioquímica do tecido sinovial lesado (WALSH et al,1997).

Em 1962, Barland et al. caracterizou por microscopia eletrônica dois tipos distintos de sinoviócitos, que não poderiam ser diferenciados morfológicamente à microscopia óptica, um com características de macrófago (tipo A) e o outro com de fibroblasto (tipo B), com características ultraestruturais e funcionais diferentes, tais como fibrillogênese, fagocitose, síntese de hialuronato e de mediadores de baixo peso molecular como IL-1, prostaglandinas (PG) e proteases (GALLAGHER, 1993). A sinóvia normal é composta predominantemente por células fibroblasto-símile (tipo B), sendo que somente 10 a 20% das células de revestimento são macrófago-símile (tipo A). As células fibroblasto-símile, como outros fibroblastos, expressam a enzima de síntese de colágeno prolil-hidroxilase, que sintetiza componente fibrilar da matriz extracelular e apresenta potencial proliferativo.

Através de técnicas citoquímicas que demonstram os produtos de síntese de genes individuais ou de RNA mensageiro, tornou-se possível identificar as duas populações de células da íntima através da microscopia óptica. Os macrófagos (sinoviócitos tipo A) mostram alta atividade de

esterase não específica (NSE), enquanto os fibroblastos (sinoviócitos B) mostram intensa atividade da enzima uridino difosfo-glucose desidrogenase (UDPGD), e proeminente expressão de moléculas presentes na superfície celular, incluindo moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e o fator de diminuição da aceleração de complemento (DAF).

Os sinoviócitos tipo A são fagocíticos, carregam marcadores característicos da linhagem dos macrófagos maduros, têm pouca capacidade de se proliferar, e são recrutados da circulação durante a inflamação sinovial, localizando-se na íntima e subíntima. No tecido normal eles mostram evidente atividade esterase não específica (NSE), expressam CD68, que é considerado um marcador macrofágico seguro e expressam pequena quantidade de CD14 (EDWARDS,1995).

A cultura de fibroblastos proveniente da sinóvia inflamada mostra produção de altos níveis de metaloproteinases (KRANE,1982). Os fibroblastos da íntima sinovial expressam proeminente número de moléculas de superfície envolvidos na ligação a outras células ou componentes da matriz extracelular como o VCAM-1, moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), CD44 e $\beta 1$ integrinas (EDWARDS,1995).

As moléculas de adesão são distribuídas desigualmente nas várias regiões da sinóvia. Por exemplo, a E-selectina (ELAM-1) é expressa em pequena quantidade nas pequenas vênulas abaixo da íntima do tecido normal. Moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1) por outro lado, estão geralmente expressas sobre grandes vênulas profundas. Esta distribuição diferencial das moléculas de adesão pode ter alguma relação com o padrão

de infiltrado celular linfóide e mielóide observado no tecido inflamado (EDWARDS, 1995).

Através de técnicas citoquímicas demonstrou-se que os fibroblastos da íntima sinovial são especializados na síntese de ácido hialurônico, além de outras inúmeras funções. O ácido hialurônico possui várias funções biológicas que incluem papel na formação de cavitações durante o desenvolvimento articular do embrião, na regulação de interação célula-célula e célula-matriz e lubrificação na articulação madura. No líquido sinovial reumatóide, o ácido hialurônico está estruturalmente modificado, e pode estar diretamente envolvido na patogênese da sinovite, através de seu potencial angiogênico (EDWARDS, 1995).

A matriz intimal contém uma grande quantidade de ácido hialurônico, e este está intimamente associado com as células de revestimento, que se estendem de 20 a 50 μm para dentro dos tecidos. Isto pode indicar uma difusão do ácido hialurônico abaixo da superfície próximo aos linfáticos que pode acontecer se houver relativa perda do rearranjo da matriz da íntima.

A íntima apresenta estrutura matricial composto de fibras de colágeno tipo I, mas contém os colágenos menores, incluindo os tipos III, IV, V e VI. A matriz da íntima também contém laminina, fibronectina, e condroitina-6-sulfato rico em proteoglicano (C-6-SP). Apesar de não apresentar membrana basal, a íntima sinovial contém componentes normalmente presentes nesta estrutura, como o colágeno tipo IV, laminina, e C-6-SP. A aparente perda da estrutura da matriz da íntima, pode ser explicada com base na ausência da

entactina, que está relacionada com a ligação dos componentes da membrana basal.

A análise do fluido sinovial, obtida de articulações de doentes com artrite reumatóide contém colágenos dos tipos I, III e V na mesma proporção que a encontrada no tecido sinovial (GALLAGHER,1993). Numerosas interações moleculares acontecem entre o colágeno e os outros componentes do tecido conjuntivo, como laminina, elastina, heparina, sulfato de condroitina, certos proteoglicanos e fibronectina. Há também interações específicas entre os colágenos tipos I, III, VI e os tipos V, IX, X, que quando associados formam fibrilas compostas.

Modelos experimentais de artrite em animais

O papel do colágeno nas doenças autoimunes tem sido extensivamente estudado, e a utilização de modelos animais de artrite, têm contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos patogénéticos envolvidos no desencadeamento da artrite inflamatória crônica e de doenças autoimunes em geral.

Dentre os vários modelos descritos, a artrite induzida por colágeno tem sido o modelo de escolha para o teste de novos agentes terapêuticos, em especial da AR por ser a mais caracterizada com relação a sua

patogênese e substrato imunológico. Foi relatada primeiramente por Trentham et al em 1977, que observaram a doença em ratos após injeção intradérmica de colágeno tipo II associado ao adjuvante de Freund. Estudos posteriores demonstraram que artrite similar poderia também ser induzida em outros animais susceptíveis, como os primatas e em determinadas linhagem de camundongos. AIC pode ser induzida usando o colágeno tipo II nativo autólogo ou heterólogo, e a reação inflamatória não ocorre com imunização dos colágenos tipos I ou III. Tanto o adjuvante completo (ACF) como o incompleto de Freund podem ser usados como iniciadores da AIC em ratos. Já a indução da doença em camundongos requer geralmente a presença de *Mycobacterium tuberculosis* mortos por calor presente no adjuvante completo de Freund.

A imunização com CII/ACF resulta em uma poliartrite de instalação rápida e grave em articulações periféricas, que aparece por volta de três a quatro semanas depois da inoculação, tornando-se progressivamente pior após aproximadamente duas a quatro semanas, antes de melhorar lentamente. Embora a patologia seja similar quando AIC é induzida com CII autólogo ou heterólogo, a natureza da doença é diferente; o CII autólogo induz uma doença mais crônica, com um atraso no início e penetrância reduzida. Em ambos os casos a histopatologia da artrite inflamatória sugere o acometimento presente na artrite reumatóide humana. Como a AR, a AIC é caracterizada pela presença de deposição de fibrina, hiperplasia das células sinoviais, formação de osso periosteal, infiltrado mononuclear, formação de pannus e eventual anquilose de uma ou mais articulações.

Além disso, a presença de fator reumatóide e manifestações sistêmicas tem sido relatadas em animais com AIC. Igualmente, a susceptibilidade tanto da AIC quanto da AR estão altamente associadas com a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II, com papel adicional para locus não MHC sendo relatados (LUROSS, 2001).

Também pode-se reproduzir artrite experimental destrutiva semelhante à AR empregando-se outros componentes da cartilagem como os proteoglicanos, porém o fenômeno é observado apenas em camundongos da linhagem BALB/c (HOLMDAHL et al. 1988; HOLMDAHL et al. 1990; STUART et al. 1982) Assim como na artrite induzida por colágenos, admite-se a participação de antígenos da classe II do complexo HLA, que contribuiriam no reconhecimento de epítomos presente nestas macromoléculas, originando população de linfócitos T CD 4+ autoreativas, que por sua vez ativariam linfócitos B a produzirem autoanticorpos, e gerando também células T efectoras, estando ambas as respostas autoimunes dirigidas contra componentes da cartilagem, iniciando-se a resposta inflamatória articular. A lesão articular progressiva promoveria a exposição de novos epítomos ocultos, antígenos normalmente protegidos do sistema imunológico, contribuindo para a perpetuação e agravamento do dano articular.

Interessante observar que estímulos imunológicos inespecíficos também podem induzir artrite em animais susceptíveis (BILLIGHAM, 1995). O exemplo clássico é a indução da artrite pelo adjuvante (substância capaz de provocar estímulo imunológico indireto) em ratos (HOLOSHITZ, 1984).

Desconhecem-se os mecanismos que provocariam artrite nesta espécie animal, se seria pelo óleo presente no adjuvante incompleto de Freund, ou se pelo estímulo desencadeado pela *M. tuberculosis*, no adjuvante completo (possivelmente devido a participação do “heat shock protein”- HSP).

Trabalhos recentes mostram que tanto o adjuvante incompleto de Freund, como o óleo mineral conhecido como pristane, podem causar artrite em ratos e camundongos (WOOLEY, 1989; KLEINAU, 1991). Sugere-se que o óleo seja um componente crítico na indução da artrite, mas desconhece-se se por ação direta tóxica, ou pelo efeito secundário, ao promover a exposição de antígenos autólogos secundário à agressão exógena. Admite-se que em animais susceptíveis como ratos e camundongos, macrófagos fagocitem o óleo tornando-se altamente ativados, produzindo citocinas inflamatórias como IL-1, TNF-1, IL-6 e gama interferon (IFN), promovendo a ativação policlonal de linfócitos T e B. As citocinas produzidas também promoveriam a ativação de condrócitos e de células sinoviais, contribuindo para o agravamento da lesão articular por mecanismos imunológicos. Esta hipótese é reforçada no caso da artrite induzida pelo pristane, pois observa-se linfadenopatia e hipergamaglobulinemia nos animais imunizados, incluindo a presença de autoanticorpos contra constituintes da cartilagem, fator reumatóide e HSP (VAN EDEN, 1989). A instalação da artrite no modelo induzido pelo adjuvante completo/incompleto de Freund ocorre de maneira rápida e grave (16-19 dias), e mais lentamente de forma menos destrutiva quando induzida pelo pristane (3 a 6 meses). Em ambos os modelos, observa-se importante proliferação sinovial, intensa expressão de

antígenos HLA classe II e moléculas de adesão, além da síntese aumentada de componentes da matriz extracelular (EDWARDS,1995).

Em outro modelo experimental com artrite induzida por antígeno, observada em coelhos, e na maioria dos roedores pela injeção intra-articular de uma proteína solúvel (classicamente a albumina bovina metilada: BSA), em joelho de animais previamente imunizados com o antígeno (BSA), associado com o adjuvante completo de Freund, a artrite é confinada à articulação inoculada (HOWSON, 1986). A histologia sinovial neste modelo é semelhante com a visualizada na AR, com presença de células inflamatórias, especialmente linfócitos T CD4+, linfócitos B, mastócitos e macrófagos. A necessidade da presença do antígeno na articulação para que ocorra a inflamação, faz supor que o mecanismo imunológico responsável pela artrite seja mediado por imunecomplexos (BRACKERTZ, 1977).

Estudos em modelos experimentais e naturais mostram que agentes infecciosos estão envolvidos no desencadeamento de artrite em diferentes espécies animais (coelhos, cachorros, porcos, cabras, ratos, camundongos e hamsters). Componentes bacterianos inoculados na articulação ou injetados sistemicamente podem provocar artrite (HOWSON,1986). Agentes infecciosos têm especial tropismo pela articulação, devido a grande expressão de moléculas de adesão no tecido sinovial (PATTI,1994). A persistência de inúmeros antígenos bacterianos na infecção crônica articular pode gerar processo inflamatório e reação mediada por imunecomplexos (HERMAN,1991). Componentes da parede bacteriana e da membrana de

micoplasmas podem provocar resposta imune inespecífica pela sua atividade mitogênica. Fragmentos bacterianos em suspensão, injetados intraperitonalmente em ratos susceptíveis, podem provocar poliartrite crônica erosiva, com surtos cíclicos de atividade e remissão (KOGA, 1985).

Infecções da sinóvia por vírus podem originar neoantígenos em superfície de células, ou induzir a expressão de autoantígenos como o HSP. Neste sentido, a infecção viral pode promover quebra da homeostase imunológica, ao induzir a produção de citocinas inflamatórias, ou promovendo agressão contra antígenos “self” (WILKERSON, 1995).

As hipóteses descritas na literatura para justificar a indução de artrite por agentes infecciosos bacterianos (*Mycoplasma arthritidis*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*) ou componentes celulares (*Streptococcus ssp*, *Escherichia coli*, *Eubacterium*), valorizam a alta capacidade adesiva das células sinoviais, com conseqüente retenção de antígenos na articulação, que promoveria uma disfunção imunológica local, incluindo a produção de superantígenos. Outra possibilidade sugerida seria a existência de reação cruzada entre componentes dos microorganismos e estruturas próprias da articulação (mimetismo molecular), ou ainda a possibilidade do processo inflamatório apresentar antígenos ocultos, normalmente não expostos ao sistema imune (WOOLEY, 1998).

Modelo experimental de doença difusa do tecido conjuntivo em coelho após imunização com adjuvante de Freund e colágeno tipo V

Casualmente, durante o procedimento de obtenção de anticorpos policlonais anti-colágeno do tipo V humano em coelhos, observou-se que os animais desenvolviam alterações macroscópicas, especialmente em pulmões. Devido à reprodutibilidade do fenômeno, realizou-se análise histológica preliminar do tecido pulmonar, que revelou presença de importante processo inflamatório, e depósito de colágeno ao redor de vasos e brônquios, além do interstício. Surpreendentemente, este fenômeno não ocorria quando os colágenos dos tipos I e III eram inoculados em coelhos.

A partir desta observação inusitada, estabeleceu-se um protocolo de pesquisa, com o intuito de averiguar a dimensão científica desta descoberta original, que poderia ser considerada um novo modelo de estudo de doenças inflamatórias pulmonares. Coelhos Nova Zelândia foram imunizados com duas doses de adjuvante completo de Freund associado ao colágeno tipo V humano, administrados com intervalo de 30 dias por via subcutânea, seguido de dois reforços de antígeno associado ao adjuvante incompleto de Freund, com intervalos de 15 dias. Os animais controle receberam apenas adjuvante. Os animais foram sacrificados após 75 e 120 dias do início da imunização (TEODORO,2001).

Nesse estudo, demonstrou-se pela histomorfometria que alterações pulmonares eram proeminentes, especialmente na periferia dos lobos

basais, com 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. Exames sorológicos revelaram que os animais não só desenvolveram anticorpos dirigidos contra o colágeno tipo V inoculado, mas também aos tipos I e III. Animais controle imunizados com adjuvante completo/incompleto de Freund não apresentaram alterações pulmonares. Concluiu-se então que o modelo reproduzia achados histológicos compatíveis com os observados em algumas das doenças difusas do tecido conjuntivo, particularmente no lúpus eritematoso e esclerodermia, hipótese baseada no padrão de acometimento patológico do tecido pulmonar, onde notou-se espessamento da íntima vascular, com aparente destruição das células endoteliais, espessamento da camada muscular e depósito de colágeno no interstício pulmonar, e regiões perivasculares e peribrônquicas,

Devido à hipótese do modelo sugerir DDTC, realizou-se análise histomorfométrica preliminar dos tecidos normalmente acometidos nestas enfermidades, ou seja, pele, esôfago, coração, rim, sinóvia e articulação. Estudo à microscopia óptica com coloração pelos métodos HE e Masson, confirmaram a presença de lesões nestes órgãos, e o aspecto distintivo foi o remodelamento matricial observado nestes tecidos, confirmando o aspecto sistêmico do modelo, e com características muito semelhantes aos encontrados na esclerose sistêmica (YOSHINARI e cols., 2002).

Na tentativa de explicar as razões das alterações morfológicas observadas no modelo experimental, sugeriu-se como fator principal, as particularidades biológicas do colágeno tipo V empregada como antígeno. Na síntese da maioria dos colágenos fibrilares, normalmente ocorre a perda dos domínios globulares e telopeptídeos (NH₂ e COOH), regiões reconhecidas como altamente imunogênicas, e o fato do colágeno tipo V preservar estes domínios tornam-no bastante imunogênico. (KONOMI et al, 1984).

Além disso, o colágeno do tipo V embora presente em pequena quantidade, tem ampla distribuição, estando presente na maioria dos tecidos (ADACHI et al, 1987; ADACHI et al, 1991; DRAZEN et al, 2000). A sua presença na membrana basal de vasos e em alguns tecidos mesenquimatosos, desempenha importante papel de ligação entre o colágeno tipo IV, principal componente fibrilar da membrana basal, e diferentes componentes celulares e moleculares do tecido mesenquimatoso, contribuindo no crescimento celular e remodelamento da estrutura tecidual (INKINEN et al, 1999; FICHARD et al, 1995).

Esse colágeno também estabelece associação com outras fibrilas como os tipos I e III, presentes de forma abundante na pele e pulmões, originando fibras heterotípicas, onde normalmente epítomos do colágeno V encontram-se ocultos. O colágeno do tipo V, presente na sinóvia e cartilagem articular, apresenta similaridade molecular com o colágeno tipo XI, importante componente fibrilar na manutenção da arquitetura da cartilagem articular (LAWRENCE et al, 1994). As seqüências de

aminoácidos das cadeias $\alpha 1$ dos colágenos V e XI são homólogos e alta homologia existe entre as cadeias $\alpha 1(V)$, $\alpha 1(IX)$ e $\alpha 2(IX)$ e entre as cadeias $\alpha 2(V)$ e $\alpha 3(XI)$ (ADACHI et al, 1997). Ademais, 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)

A teoria proposta para justificar o desencadeamento de achados semelhante ao observado em pacientes com DDTC, induzida pela imunização com o colágeno do tipo V humano em coelho, aliás molécula altamente preservada entre as várias espécies animais, sugere que tenha ocorrido por estágios. Admite-se, que a agressão imunológica inicial ocorreu ao nível da camada endotelial dos vasos, pelo depósito de imunecomplexos constituídos de epítomos do colágeno V e respectivos anticorpos, com ativação do sistema complemento, causando processo inflamatório da íntima e lesão da membrana basal, em decorrência do prolongado processo de imunização.

A seguir, poderia ocorrer a perpetuação do dano vascular pela contínua exposição de antígenos autólogos do colágeno V, normalmente encontrado oculto no interior das fibras heterotípicas, associado aos colágenos dos tipos I e III, localizados na junção da membrana basal e matriz extracelular. Os neoantígenos assim expostos, fomentariam a contínua síntese de anticorpos (agora autoanticorpos) dirigidos contra o colágeno V, contribuindo para a manutenção do processo inflamatório e dano tecidual. Autoanticorpos poderiam estar igualmente dirigidos contra

epítomos do colágeno tipo XI, que tem similaridades estruturais, e presentes 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).

Justificativa e objetivos

O estudo do modelo experimental induzido em coelhos pela imunização com o colágeno tipo V reveste-se de grande importância, não apenas pela originalidade, mas pelo fato de reproduzir manifestações sistêmicas, aparentemente muito semelhantes à esclerodermia.

As perspectivas de novas linhas de trabalho são infindáveis, tanto que pesquisas têm sido realizadas no intuito de analisar acometimento particularizado de diferentes tecidos, caracterização das alterações imunológicas presentes no modelo, estudos em biologia molecular para identificação de citocinas e colágenos sintetizados pelos fibroblastos ativados, cultura *in vitro* de fibroblastos e células miofibroblásticas obtidas de artérias.

É provável que novos estudos com o modelo experimental, tragam informações importantes para o conhecimento das DDTC, incluindo novos conhecimentos dos mecanismos patogênicos envolvidos na lesão dos tecidos observados nestas enfermidades, contribuindo para a melhor abordagem terapêutica das doenças autoimunes.

No presente trabalho, o foco de estudo será a análise da sinóvia de coelhos imunizados com o colágeno tipo V, pois manifestações articulares são freqüentes nas doenças reumatológicas, e os modelos existentes reproduzem alterações sinoviais semelhantes ao visualizado na artrite reumatóide, mas não de outras DDTC. Dados histológicos preliminares sugeriram que o modelo reproduziria alterações compatíveis com as observadas no lúpus eritematoso sistêmico e esclerodermia, além de promover complicações morfológicas em múltiplos órgãos, aproximando-se assim, de um verdadeiro modelo experimental de DDTC.

Pela revisão apresentada na introdução, 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 BSA) reproduz artrite apenas na articulação inoculada com BSA em animal previamente sensibilizado. Assim, a descoberta e melhor caracterização laboratorial de um modelo original de estudo das enfermidades reumatológicas, desenvolvido em animal sadio, após inoculação de antígeno “self”, com potencial de causar comprometimento multissistêmico, contribuiria em muito para a compreensão e tratamento dos pacientes com DDTC.

O trabalho objetiva estudar em detalhes, a sinóvia de coelhos imunizados com adjuvante de Freund e colágeno V, realizando-se a análise histológica através da microscopia óptica, após coloração pelo H&E e tricrômico de Masson. O perfil de remodelamento da matriz extracelular será pesquisado pela imunolocalização dos colágenos dos tipos I, III e V no tecido sinovial, além da dosagem semi-quantitativa destes colágenos pela densitometria do material protéico obtido pela eletroforese em gel de poliacrilamida.

OBJETIVOS

No intuito de caracterizar as alterações morfológicas e bioquímicas do tecido sinovial em coelhos imunizados com colágeno do tipo V após 75 e 120 dias da primeira imunização propusemos:

Avaliar morfolologicamente o tecido sinovial corado através de hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson.

Realizar a imunohistoquímica dos colágenos dos tipos I, III e V nos animais imunizados e avaliar a distribuição destes colágenos no tecido sinovial.

Analisar as cadeias dos colágenos I, III e V obtidas pela eletroforese em gel de poliacrilamida e realizar a avaliação semiquantitativa destes colágenos por densitometria, nos animais controle e imunizados.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados coelhos da linhagem Nova Zelândia, fêmeas (n=20), com peso médio de 2500g e dois meses de idade divididos em grupos de cinco animais, controle e imunizado e obtidas as sinóvias após 75 e 120 dias da primeira imunização.

2. Obtenção do antígeno

2.1 Extração de colágeno do tipo V humano

Foram utilizadas placentas humanas normais provenientes do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O tecido foi seccionado em pequenos pedaços que foram lavados com solução de EDTA 50mM contendo inibidor de proteases (PMSF 5mM). Após lavagens sucessivas o material foi homogeneizado em “politron” e centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos.

O homogenato foi pesado e digerido com pepsina de estômago de porco (10000 UTD) (Sigma Chemical Co.) na proporção de 1:10 (1 grama de pepsina para 10 gramas de tecido) diluído em ácido acético 0,5M, pH 2,5 por 16 horas a 4°C sob agitação.

Após a digestão o material foi centrifugado a 15000 rpm por 1 hora, a 4°C, e o sobrenadante submetido ao gradiente seqüencial salino seletivo com cloreto de sódio segundo Mayne et al, 1993, nas concentrações de 0,7M, 1,0 M e 1,2M.

Na concentração de 0,7 e 1,0M foram isolados os colágenos dos tipos I e III e a 1,2M, o colágeno do tipo V. O precipitado de colágeno foi diluído em ácido acético 10mM, dialisado exaustivamente contra água destilada, para neutralização do pH da amostra, congelado e posteriormente liofilizado a -50°C.

A identificação das cadeias do colágeno tipo V extraído pela precipitação com cloreto de sódio foi realizada através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida 7,5% de acordo com metodologia descrita por Laemmli (1970). As frações do colágeno total foram previamente diluídas na proporção de 1 mg de proteína para 200 µl de ácido acético 10mM. O tampão de amostra (SDS 10%, glicerina 10%, azul de bromofenol 20% e 2-mercaptoetanol) foi acrescentado às amostras para posterior aquecimento a 100°C, por 3 minutos. Em cada “poço” do gel de poliacrilamida aplicou-se 25µg da fração de colágeno isolado, e para a corrida eletroforética utilizou-se tampão tris glicina 0,19M em pH 8,5 e SDS 0,1%, sob corrente elétrica constante de 50 volts por quatro horas.

Os géis foram corados com azul de Coomassie por 10 minutos sob agitação constante e descorado pela solução de metanol 5% e ácido acético 7,5%.

Foi realizado também o “Western Blot” e “Immunoblot” para avaliar a pureza do antígeno isolado, ao se comparar os resultados com os obtidos com o colágeno tipo V comercial (Sigma Co.).

2.1.1 “Western Blot”

O gel foi eletroforeticamente transferido para uma membrana de nitrocelulose (Sigma Chem Co) utilizando tampão tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 10%, por uma hora a 100 volts. A eficiência da transferência foi confirmada pela coloração com solução de Ponceau S 0,5% em água (Sigma Chem Co).

2.1.2 “Immunoblot”

As membranas de nitrocelulose foram incubadas por uma hora e meia à temperatura ambiente, sob agitação constante, em solução de fosfato de sódio tamponado (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico), a fim de bloquear sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose. Em seguida, a mesma foi cortada em tiras, as quais foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente com anticorpos policlonais anti-colágeno dos tipos I e V de placenta humana produzidos em coelho, na diluição de 1:200

e 1:1000, respectivamente e, anti-colágeno do tipo III monoclonal (Oncogene), obtido em camundongo na diluição de 1:80. A seguir as membranas foram lavadas três vezes com albumina bovina sérica com PBS com Tween20 0,05%. As membranas foram incubadas com anti-IgG conjugada com peroxidase anti-coelho ou anti-camundongo (1:1000) durante uma hora. Após outro ciclo de lavagem a reação foi revelada com diaminobenzidina diluída em tampão fosfato de sódio (0.16mg/ml) contendo 30% de água oxigenada.

O colágeno do tipo V foi identificado através da banda com migração de 116 Kd, correspondentes às cadeias $\alpha_{1,2,3}$ (V).

3. Protocolo Experimental

Foram inoculados 10 animais por via subcutânea com 1ml de solução de colágeno do tipo V, na concentração de 1 mg de colágeno tipo V liofilizado/ml dissolvido em ácido acético 10mM, emulsificado com igual volume de adjuvante completo de Freund. Após quatro semanas o procedimento foi repetido, na mesma dosagem.

A seguir, em intervalos de 15 dias os animais receberam dois reforços via intramuscular de 1ml de solução de 1mg de colágeno do tipo V dissolvido em 1ml de ácido acético 10mM, emulsificado com igual volume de adjuvante incompleto de Freund.

Nos animais controles (n=10) foram inoculados 1ml de solução de ácido acético 10mM emulsificado com igual volume de adjuvante completo (primeira e segunda doses), seguidos de outras duas inoculações de adjuvante incompleto de Freund nas mesmas datas.

Após um período de 75 dias da primeira imunização foram coletadas as sinóvias de cinco animais imunizados e cinco controles para o estudo. As sinóvias dos animais restantes (n=10) foram obtidas após 120 dias da primeira imunização (Figura 5, pág 33).

4. Coleta do tecido sinovial

Após os períodos estabelecidos de imunização (75 e 120 dias) os animais foram sedados com solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino) 5,6-dihidro-4H 1,3-tiazina 1M (1,5ml) (Rompum, Bayer do Brasil S.A.), e após 5 minutos administrado dose letal de cloridrato de cetamina 1M (4,5ml) (Ketalar, Park-Davis). Imediatamente após este procedimento a cavidade articular foi aberta e coletou-se a sinóvia de ambos os joelhos das patas posteriores. As sinóvias dos joelhos direito e esquerdo foram divididas em duas partes, sendo uma porção de cada joelho fixada em formol 10% para análise anátomo-patológica e reação de imunohistoquímica. A outra porção do tecido foi congelada a -20°C em soro fisiológico para isolamento bioquímico dos colágenos I, III e V e posterior densitometria.

PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO COM COLÁGENO DO TIPO V

Figura 5: Protocolo experimental

5. Histologia

Os fragmentos de sinóvia previamente fixados em formol a 10%, foram desidratados por concentrações crescentes de álcool etílico (75%-100%) e xilol, incluídos em parafina e seccionados em cortes de 5 μ m, como procedimentos histológicos de rotina. As preparações foram coradas pela hematoxilina-eosina e pelo tricrômico de Masson e examinadas em microscópio óptico (Nikon).

6. Imunofluorescência indireta

Cortes transversais de sinóvia de coelhos preparados em lâminas tratadas com 3-aminopropilttriethoxy Silano (Sigma Co.), foram imersos em xilol a 60°C por 20 minutos. Posteriormente os cortes foram imersos em dois banhos de xilol a temperatura ambiente e sucessivas lavagens com álcool etílico, em concentrações decrescentes (100%, 95% e 75%), água corrente, água destilada e tampão fosfato (PBS). Para exposição e recuperação dos sítios antigênicos, o material foi digerido com 2mg de pepsina de porco (10000 U/ml) (Sigma Co) dissolvida em ácido acético 50mM por 30 minutos a 37°C. Os cortes foram lavados por três vezes de 10 minutos cada, com PBS. Os sítios antigênicos inespecíficos foram bloqueados com leite desnatado (Molico) a 5% por 30 minutos. Os cortes foram posteriormente incubados com anticorpos primários, anticolágeno tipo I e V policlonal

produzidos em camundongo, nas concentrações de 1:15 e 1:250 respectivamente, e de 1:80 para o anticolágeno tipo III monoclonal (Oncogen) em lâminas separadas e mantidos por uma noite a 4°C. As lâminas foram lavadas com PBS com Tween20 a 0,05% por três vezes de 10 minutos e incubadas com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma) diluído na proporção de 1:50 nas lâminas com anticolágeno tipo I, e de 1:80 para as lâminas com anticolágeno tipo III e tipo V, em solução de PBS contendo azul de Evans 0,003% por 1 hora e 30 minutos e novamente lavadas com PBS com Tween20 a 0,05% por seis vezes de 5 minutos. Depois, as lâminas foram montadas com solução de glicerina tamponada. A reação foi visualizada em microscópio de fluorescência marca Nikon.

7. Extração e mapeamento bioquímico das cadeias dos colágenos I, III e V

Após a retirada das sinóvias, metade das porções retiradas de cada joelho (direito e esquerdo), foram seccionados em pequenos pedaços, que foram lavados com solução de EDTA 50mM contendo inibidor de proteases (PMSF 5mM). Após lavagens sucessivas o material foi homogeneizado em “politron”, centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos.

O homogenato foi pesado e digerido com pepsina de estômago de porco (10000 UTD) (Sigma Chemical Co) na proporção de 1:10 (um grama

de pepsina para dez gramas de tecido) diluído em meio ácido (ácido acético 0,5M, pH 2,5) por 16 horas a 4°C sob agitação constante.

Após digestão o material foi centrifugado a 15000 rpm por 1 hora a 4°C, e ao sobrenadante adicionado cloreto de sódio 2M segundo metodologia descrita por MAYNE (1993).

O colágeno precipitado foi diluído em ácido acético 10mM, dialisado exaustivamente contra água destilada, para neutralização do pH da amostra, congelado e liofilizado a -50°C.

Para se proceder à identificação das cadeias do colágeno V, presentes no tecido sinovial, utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida 7.5% conforme descrição de LAEMMLI em 1970.

As frações do colágeno total foram previamente diluídas na proporção de 1 mg de proteína para 200 µl de ácido acético 10mM, o tampão de amostra (SDS 10%, glicerina 10%, azul de bromofenol 20% e 2-mercaptoetanol) foi acrescentado às amostras para posterior aquecimento a 100°C, por 3 minutos. Em cada “poço” do gel de poliacrilamida aplicou-se 25µg da fração de colágeno isolado, e para a corrida eletroforética utilizou-se tampão tris glicina 0,19 M em pH 8,5 e SDS 0,1%, sob corrente elétrica constante de 50 volts por quatro horas.

O gel foi corado com azul de Coomassie por 10 minutos sob agitação constante. Para a remoção do excesso do corante, foi utilizada uma solução de metanol 50% e ácido acético 7,5%.

As cadeias dos colágenos dos tipos I e III das sinóvias foram identificadas por eletroforese do gel de poliacrilamida/SDS-PAGE 6,5%,

acrescido de uréia 5M (Sigma Co.), corado da mesma maneira que os colágeno V.

7.1 Densitometria

Os géis corados com azul de Coomassie foram submetidos a leitura em densitômetro Image Master VDS (Pharmacia Biotech) para a análise das frações isoladas dos colágenos I, III e V. Os resultados foram expressos através da intensidade de expressão (unidade arbitrária) da área das cadeias alfa dos colágenos estudados.

7.2 Análise estatística

Para testar a hipótese sobre a influência do colágeno tipo V na patogênese da doença, comparamos os resultados obtidos de densitometrias de animais imunizados com os controles e utilizamos como tratamento estatístico o teste-T de Student. A análise estatística foi realizada pelo programa estatístico SPSS versão 10.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL). O nível de significância estatística foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Resultados morfológicos

1. Análise histológica

A superfície sinovial, observada através da coloração de hematoxilina-eosina, nas amostras controle, demonstrou a presença de 1 a 3 camadas de células (sinoviócitos) e vasos de pequeno calibre, sustentados por um tecido conjuntivo frouxo, desprovido de células inflamatórias, onde encontramos vasos com histoarquitetura preservada (Figura 6 Painéis A-F). É importante salientar que a superfície sinovial, assim como o tecido conjuntivo subsinovial e vasos, obedeceram o padrão morfológico normal (Figura 6, Painéis A-B) entre os diferentes grupos de animais controle (75 e 120 dias) (Figura 6, Painéis C-F).

Figura 6 (Painéis A-F): Cortes transversais de sinóvia corados por H&E. Nos painéis A e B, observamos sinóvias obtidas de animais normais mostrando superfície sinovial uniforme com celularidade normal. Nos painéis C a F, sinóvias de animais sensibilizados com adjuvante de Freund obtidas após 75 (C e D) e 120 dias (E e F) após a primeira imunização, mostrando o mesmo padrão observado nos animais normais. Notar a integridade do endotélio e subendotélio dos vasos sinoviais. (A-F, 200X)

Após 75 dias de imunização com colágeno V, a superfície sinovial mantém o mesmo número de camadas de células, porém observamos o remodelamento da matriz extracelular tanto na superfície como na região subsinovial (Figura 7 painel C-E, H&E), principalmente ao redor dos vasos, onde se observa também, deformidade vascular (Figura 7 painel F, seta, HE). Notar que a sinóvia em estudo apresenta sinovite não inflamatória, com presença inexpressiva de células inflamatórias.

Figura 7: Cortes transversais de sinóvia de coelho corados por H&E. Em A e B, controles normais. Nos painéis de C a F sinóvias coletadas após 75 dias de imunização com colágeno V. Notar o remodelamento circundando as artérias da região subsinovial. Notar em F a presença de lesão endotelial e deformidade vascular (seta) (C a E, 200X; A, B e F, 400X)

Como continuação do processo inicialmente analisado em 75 dias, em 120 dias notadamente se observam alterações mais intensas da matriz sinovial e subsinovial (Figura 8 painéis C-F, HE), e o padrão não inflamatório se mantém.

Figura 8 (Painéis A-F): Cortes transversais de sinóvias de coelho coradas por HE. Em A e B, controles normais, de superfície e vaso respectivamente. De C a F cortes de sinóvia coletadas após 120 dias de imunização com colágeno tipo V. Notar o remodelamento da superfície (C e E), como também do tecido conjuntivo subsinovial e dos vasos (A, B e F, 200X; C a E, 40X)

A análise do colágeno presente nas amostras de tecido sinovial dos animais controle, realizadas através do tricrômico de Masson (observado em azul), mostrou distribuição normal do colágeno tanto na superfície como no tecido conjuntivo de sustentação e vasos (Figura 9 painéis A e B). Sinóvias de animais imunizados com colágeno do tipo V mostraram progressivo remodelamento matricial às custas de aumento de colágeno na região superficial (Figura 9, painel C), de vasos (Figura 9, painel D), como na subsinóvia (Figura 9, painel E-F).

A distribuição do colágeno observada após coloração com o tricrômico de Masson em 75 dias, demonstrou o mesmo padrão encontrado nos cortes corados com hematoxilina-eosina (Figura 7 painéis C-F, HE), confirmando o depósito de colágeno nessas regiões (Figura 9, C-F). O colágeno se distribui tanto entre a camada de sinoviócitos (Figura 9 painéis C, E e F, tricrômico de Masson), como na subsinóvia, principalmente verificada na adventícia dos vasos (Figura 9, painéis D, tricrômico de Masson).

FIGURA 9: (Painéis A-F) Cortes transversais de sinóvia corados pelo tricrômico de Masson. Painéis A e B mostram cortes de sinóvias de animais controle. Notar pela coloração azul uma fina camada de colágeno na superfície sinovial que se estende no mesmo padrão entre as células do tecido conjuntivo frouxo (A, seta). Observar em B a localização do colágeno nas diferentes regiões do vaso. Após 75 dias da primeira imunização com colágeno V é claramente notado em C o colágeno envolvendo a camada de células superficiais, assim como a união através do colágeno da túnica adventícia de vasos de médio e pequeno calibre (D). Observar em F, detalhe do remodelamento sinovial, alterando toda a estrutura do tecido. (A-D e F, 200X; E, 40X)

Na figura 10, (Painéis A-F) observamos tecido sinovial de animais imunizados com colágeno do tipo V após 120 dias e corados pelo tricrômico de Masson. Observou-se nítido aumento no remodelamento em todos os segmentos sinoviais inclusive regiões perivasculares. O colágeno é encontrado difusamente no tecido, mas principalmente circundando as células superficiais e ao redor dos vasos, modificando a conformação dos mesmos (Figura 10 painéis C a F).

FIGURA 10: (Painéis A-F): Cortes transversais de sinóvia corados pelo tricrômico de Masson. Painéis A e B sinóvia provenientes de animais controle. Após 120 dias da primeira imunização (Painéis C a F) notar o extenso remodelamento do colágeno no tecido conjuntivo frouxo representado em azul. Em D notar que o colágeno na túnica adventícia se difunde no tecido conjuntivo resultando em um padrão heterogêneo com envolvimento de pequenos vasos e capilares. Em E e F observamos através da coloração em azul o extenso processo de remodelamento nesse período de imunização (A,B,D,F 200X; C e E 40X)

2. Imunofluorescência do colágeno

Para se identificar como se processa o remodelamento dos tipos de colágeno na sinóvia após imunização com o colágeno V, foi utilizada a marcação com anticólageno tipos I, III e V.

O colágeno do tipo I nos animais controle apresentou-se com um padrão de fibras espessas, observando-se uma maior intensidade de marcação nas camadas superficial e adventícia dos vasos (Figura 11, A-B, setas). A expressão do colágeno do tipo I em 75 dias apresentou-se mais intensa na superfície sinovial, estendendo-se ao tecido conjuntivo subjacente e na camada adventícia dos vasos (Figura 11, C-D). Aos 120 dias após a primeira imunização a expressão para colágeno do tipo I foi positiva também na camada média dos vasos (Figura 11, F), além da expressão na região superficial (Figura 11, E). Notar o aumento expressivo do colágeno tipo I na íntima e adventícia dos vasos levando à oclusão da luz vascular (Figura 11, Painel D)

Figura 11: (Painéis A-F) Imunofluorescência para colágeno do tipo I. Observa-se na sinóvia normal (A) a expressão de colágeno do tipo I envolvendo os sinoviócitos e de forma tênue no tecido conjuntivo frouxo da região subsinovial, e na camada adventícia da artéria normal da região subsinovial em B. Após 75 dias da imunização com colágeno do tipo V, observa-se o colágeno I se estendendo ao conjuntivo frouxo adjacente (C) e nas regiões vascular e perivascular (D). Após 120 dias nota-se forte expressão de colágeno do tipo I na superfície sinovial (E), e depósito vascular em F (A e C, 200X; B, D-F, 400X)

O colágeno do tipo III foi observado na forma de fibras finas e alongadas, entre os sinoviócitos, e em menor intensidade que o colágeno do tipo I em animais controle (Figura 12, Painel A-B). Nos vasos de animais controle, o colágeno do tipo III foi mais expresso na camada adventícia das arteríolas (Figura 12, Painel B) e vênulas. Após 75 dias da primeira imunização as fibras de colágeno se distribuem além da camada superficial, no tecido conjuntivo subjacente. Na região vascular observou-se (Figura 12, painel D) o espessamento da camada adventícia decorrente do depósito de colágeno do tipo III. A Figura 12, Painéis E e F demonstrou aos 120 dias da primeira imunização um total remodelamento do tecido sinovial e subsinovial, com um aumento da expressão do colágeno do tipo III ao redor dos vasos.

Figura 12: (Painéis A-F) Imunofluorescência para colágeno do tipo III. Nos painéis A e B observa-se o colágeno do tipo III fracamente expresso entre as células sinoviais, tecido conjuntivo adjacente e túnica adventícia das artérias. Após 75 dias da primeira imunização (C e D) a expressão torna-se mais intensa nas regiões subsinovial, vascular e perivascular. Notar a maior expressão do colágeno III na túnica adventícia (D) que se estende ao tecido conjuntivo adjacente (E) após 120 dias, envolvendo os vasos (F) (A-D,F, 400X;E, 200X)

A análise da expressão de colágeno do tipo V nos animais controle obedeceram a um padrão de fibras finas, típicas do colágeno do tipo V, e localizaram-se na superfície sinovial, na íntima e adventícia dos vasos, apresentando pouca expressão no tecido conjuntivo adjacente em animais controle (Figura 13, Painéis A-B). Na figura 13, painel C, o padrão de marcação torna-se mais intenso, com fibras mais espessas nos animais após 75 dias de imunização. Na região vascular o colágeno do tipo V se distribui na camada adventícia, estendendo-se a todo o conjuntivo adjacente (Figura 13, Painel D). Nos animais após 120 dias a expressão de colágeno do tipo V está presente em forma de fibras mais espessas comparados com os animais controle (Figura 13, A-B, E-F). No painel F desta figura, observamos a união das camadas adventícia dos vasos com o tecido conjuntivo frouxo, nos animais após 120 dias da primeira imunização.

Figura 13: (Painéis de A–F) Sinóvia de coelho marcado com colágeno do tipo V. Em A e B marcação normal do colágeno V, em região superficial, perivascular e abaixo da lâmina basal do vaso. De C a F aumento substancial do colágeno V em animais imunizados com colágeno do tipo V após 75 (C e D) e 120 dias de imunização (A-F, 400X)

Resultados bioquímicos

1. Identificação dos colágenos I, III e V por “Immunoblot”

A análise das cadeias de colágeno pela incubação com anticorpos anti-colágeno I, III e V confirmaram a presença e mobilidade das cadeias de colágeno encontradas no mapeamento eletroforético. Foi confirmada a presença das cadeias dos colágenos I, III e V nos animais imunizados e em seus respectivos controles, relacionando a mobilidade eletroforética com a leitura densitométrica das amostras (Fig.14).

Figura 14: Identificação dos colágenos I, III e V por “Immunoblot”

2. Mapeamento e quantificação dos colágenos

Após o tratamento dos colágenos intersticiais pepsino-solúveis com NaCl 2,0M, pH2,5, precipitamos os colágenos I, III e V das amostras de sinóvias demonstrados nas figuras 15 e 18.

Observamos que o perfil eletroforético nas amostras dos grupos controle e imunizado, submetidos à redução pelo β -mercaptoetanol em gel de poliacrilamida 7,5% em presença de SDS e uréia 5M, apresentaram bandas com migração de 108, 97 e 84 Kd, correspondendo às cadeias α_1 (III), α_1 (I) e α_2 (I) em amostras de sinóvias controle e imunizados (Fig 15).

FIGURA 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% com β -mercaptoetanol em presença de SDS e uréia 5M para identificação do colágeno I e III. Em 1, sinóvia proveniente de animal controle e em 2 e 3 imunizado de 75 e 120 dias, respectivamente

Resultados descritivos da análise densitométrica dos colágenos dos tipos I e III mostraram (média $\pm$ desvio padrão) para o grupo controle (164,91 $\pm$ 15,67) e imunizado (407,69 $\pm$ 80,31) do colágeno do tipo I (Fig 16), e controle (12,89 $\pm$ 1,05) e imunizado (24,46 $\pm$ 2,58) do colágeno do tipo III (Fig.17), que os dois tipos de colágeno apresentaram no grupo controle um

padrão mais homogêneo. Aplicando o teste “t-student”, que compara a média de amostras independentes entre o grupo controle e imunizado com um nível descritivo $p=0,0001$, supondo um nível de significância (α) de 5%, temos que $p<\alpha$, que nos faz concluir que os grupos de animais imunizados apresentaram maior quantidade de colágenos I e III em relação aos respectivos controles. Os resultados obtidos com a análise comparativa do aumento do colágeno I e III podem ser visualizados na tabela 1 e 2.

Grupos	Média	Desvio padrão	p
Imunizado	407,69	80,31	0,0001
Controle	164,92	15,67	

Tabela 1: Análise comparativa do grau de aumento do colágeno do tipo I nos animais controles e imunizados através do teste “t”.

Grupos	Média	Desvio padrão	p
Imunizado	24,46	2,58	0,0001
Controle	12,89	1,05	

Tabela 2: Análise comparativa do grau de aumento do colágeno do tipo III nos animais controles e imunizados através do teste “t”.

FIGURA 16: Box plots ilustrando a diferença significativa ($p=0,0001$) no grau de espessamento de colágeno do tipo I entre os animais controles e imunizados.

FIGURA 17: Box plots ilustrando a diferença significativa ($p=0,0001$) no grau de espessamento de colágeno do tipo III entre os animais controles e imunizados.

Observamos na figura 18, as bandas correspondentes às cadeias $\alpha_{1,2,3}(V)$, com 116 Kd, expressa tanto nos animais controle como nos imunizados. A análise descritiva destas amostras submetidas à densitometria para o colágeno do tipo V (média $\pm$ desvio padrão) nos grupos controle ($32 \pm 3,57$) e imunizado ($70,51 \pm 7,66$), indicaram que o grupo controle para este colágeno também se mostrou mais homogêneo (Fig.19). Aplicando o teste “t-student”, do mesmo modo como os colágenos I e III, podemos concluir o aumento do colágeno do tipo V no grupo imunizado com relação ao grupo controle. Os resultados obtidos com a análise comparativa do aumento do colágeno V podem ser visualizados na tabela 3.

FIGURA 18: Eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5% com β -mercaptoetanol em presença de SDS para identificação do colágeno V. Em 1, padrão do colágeno V; em 2, 3 e 4, colágeno de sinóvia obtida respectivamente de animal controle, imunizado após 75 e 120 dias, respectivamente

Grupos	Média	Desvio padrão	p
Imunizado	70,50	7,65	0,0001
Controle	32,00	3,57	

Tabela 3: Análise comparativa do grau de aumento do colágeno do tipo V nos animais controles e imunizados através do teste “t”.

FIGURA 19: Box plots ilustrando a diferença significativa ($p=0,0001$) no grau de espessamento de colágeno do tipo V entre os animais controles e imunizados.

DISCUSSÃO

O envolvimento articular é uma complicação comum nas doenças reumatológicas e o padrão de acometimento varia amplamente, de acordo com a enfermidade. A sinovite identificada na artrite reumatóide exibe importante proliferação das células da superfície sinovial, tem riqueza de células inflamatórias, desenvolve tecido de granulação conhecida como “pannus”, responsável pela destruição de cartilagem articular e aumento na produção do líquido sinovial inflamatório. Por outro lado, doenças como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e esclerose sistêmica progressiva apresentam sinovite de aspecto histológico menos inflamatório, com remodelamento da matriz às custas do aumento do tecido conjuntivo, especialmente localizados em vasos e interstício (LE ROY, 1996; NATOUR et al, 1991).

As alterações morfológicas articulares observadas no presente modelo de doença difusa do tecido conjuntivo (DDTC) obtido em coelhos através da imunização com colágeno tipo V humano, são bastante semelhantes às observadas na esclerodermia e lúpus eritematoso sistêmico (YOSHINARI et al, 2002).

Na literatura existem inúmeras descrições de modelos experimentais de artrite, desenvolvidos com objetivos de esclarecer os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento das diferentes doenças

reumatológicas, assim como contribuir na padronização de drogas anti-reumáticas no tratamento de enfermos humanos com DDTC.

Entre esses modelos, a artrite induzida por colágeno (AIC) é a mais estudada, para o entendimento da patogênese e mecanismos imunológicos envolvidos na artrite experimental, observada em animais susceptíveis como ratos, camundongos e primatas (COURTENAY et al 1980; KLARESKOG et al 1987). O modelo reproduz aspectos morfológicos vistos na artrite reumatóide (AR) e é obtida através da imunização desses animais com colágeno tipo II, o que os leva a reproduzirem intensa sinovite com abundante quantidade de células inflamatórias e formação de “pannus”, além de desenvolvimento de erosões na cartilagem e osso subcondral, similares às alterações encontradas na AR humana (TRENTHAM et al, 1977; KEMPT et al, 1981).

Convém salientar que coelhos não desenvolvem artrite experimental em resposta ao colágeno tipo II, nem tampouco respondem ao emprego isolado de adjuvante de Freund (completo ou incompleto). Contudo, consegue-se desenvolver modelo de artrite em coelhos, ao se realizar prévia imunização e sensibilização do animal dirigido contra o antígeno protéico solúvel (classicamente a albumina bovina metilada) associado ao adjuvante completo de Freund, seguido de inoculação da mesma proteína no joelho do coelho, quando ocorre desenvolvimento de importante artrite local (HOWSON, 1986). A artrite confinada à articulação injetada com albumina é de desenvolvimento precoce e semelhante à observada na AR, com infiltrado constituído de linfócitos T (preferencialmente CD4 +), linfócitos B,

mastócitos e macrófagos, e acredita-se que a patogênese esteja ligada à formação de imunecomplexos.

Em nosso modelo experimental, ao contrário do exuberante processo inflamatório observado nos modelos que reproduzem a AR, observa-se importante remodelamento da matriz extra celular, caracterizado pela presença de fibrose, secundário ao depósito do colágeno dos tipos I e III, confirmados pela imunohistoquímica e análise bioquímica. O acometimento de vasos foi marcante, com espessamento da íntima, oclusão do lúmen e destruição da camada endotelial. O infiltrado inflamatório foi escasso, e os resultados histológicos e bioquímicos, sugeriram a descoberta de um modelo original de sinovite experimental, muito sugestivo ao encontrado no LES e esclerodermia (LE ROY,1996; NATOUR et al,1991). Interessante comentar que a intensidade das alterações foi progressivamente maior, proporcional ao tempo decorrido do término das imunizações, dado que reproduz a evolução vista em DDTC.

O resultado mais interessante do presente estudo foi a aumentada expressão do colágeno tipo V, confirmados pela imunohistoquímica e análise bioquímica. O deposição desse colágeno ocorreu em vasos e matriz sinovial, e o ensaio de imunolocalização permitiu mostrar que o colágeno tipo V acumulado exibia padrão morfológico estrutural diferente do habitual. Normalmente a rede fibrilar do colágeno tipo V é fina e presente em pequena quantidade de permeio com as fibras dos tipos I e III. No presente modelo, o depósito tecidual do colágeno V foi bastante aumentado e alterado do ponto de vista morfológico, exibindo fibras densas, agrupadas e irregulares. Este

achado não é reportado na literatura e na discussão será enfatizada a importância deste depósito anômalo desse colágeno, como possível fator causal na modificação das propriedades físicas e biológicas do tecido mesenquimatoso no presente modelo, assim como em determinadas DDTC, particularmente na esclerodermia. A princípio, excluímos a influência de fatores extrínsecos, como o papel de anticorpos dirigidos contra a molécula do colágeno tipo V, como causa do desenvolvimento da rede fibrilar aberrante no modelo experimental, pois fibroblastos e miofibroblastos mantidos em cultura, isolados respectivamente da pele e artéria pulmonar, exibem o mesmo padrão anormal de síntese de colágeno tipo V (PRIZON, 2003).

O primeiro estudo com o modelo experimental de DDTC induzido pela imunização com colágeno do tipo V foi realizado por TEODORO (2001) em tecido pulmonar. A análise morfológica demonstrou a presença de importante depósito de colágenos ao redor de brônquios e vasos, espessamento das paredes vascular e brônquica e infiltrado pulmonar por células inflamatórias, inclusive o processo de fibrose acometia o interstício nos animais sacrificados tardiamente (120 dias).

Essas alterações histológicas estiveram restritas aos coelhos imunizados com colágeno tipo V, pois animais inoculados com os colágenos dos tipos I ou III não causaram doença. Reforçando a hipótese do modelo reproduzir enfermidade autoimune, os animais desenvolveram anticorpos dirigidos não apenas contra o colágeno tipo V, mas também dirigidos aos tipos I e III. Concluiu-se que estas alterações encontradas em pulmões eram

semelhantes às encontradas nos pacientes com doenças difusas do tecido conjuntivo (TEODORO et al, 2004).

Devido ao importante comprometimento vascular visualizado nos pulmões de coelhos imunizados, com predomínio de proliferação da íntima e lesão endotelial, além da fibrose intersticial, sugeriu-se que o modelo experimental reproduzia as alterações morfológicas encontradas na esclerodermia. Assim, pensou-se que as lesões teciduais poderiam estar presentes em outros tecidos, a exemplo do que ocorre nessa enfermidade. Procedeu-se o estudo histológico dos tecidos habitualmente acometidos na esclerodermia, como a pele, o esôfago, o coração, a articulação e o rim. Os resultados confirmaram que o modelo não só reproduzia alterações sistêmicas, mas promovia também, as mesmas modificações estruturais vistas na esclerodermia, ou seja, importante vasculite e remodelamento matricial (YOSHINARI et al em 2002).

A histologia da pele revelou fibrose por aumento do depósito de colágeno, espessamento da derme, proliferação da íntima vascular, com diminuição do lúmen do vaso, discreto infiltrado inflamatório, sugerindo a fase proliferativa da esclerodermia. Outra similaridade existente entre esse modelo com a enfermidade humana foi o aumento da expressão dos colágenos I e III, descritos como uma das principais alterações que ocorrem na pele dos pacientes com esclerodermia. Demonstrou-se que além destes tipos de colágeno intersticiais, o colágeno do tipo V também se expressou em maior quantidade, identificados tanto na biópsia de pele como na cultura de fibroblastos de coelhos imunizados. Curiosamente, imunohistoquímica

realizada em peles de doentes com esclerodermia, assim como em culturas de fibroblastos, formas localizada e sistêmica, revelaram os mesmos resultados verificados no modelo animal, ou seja, expressão aumentada do colágeno tipo V (BEZERRA et al 2005. Encaminhado para publicação).

Cultura “in vitro” da artéria pulmonar isolada de coelho imunizado com colágeno tipo V, também mostrou maior expressão da proteína α -actina, sintetizada pelas células miofibroblásticas, indicando existir remodelamento da parede arterial, às custas da maior produção da matriz fibrosa, justificando o espessamento da camada íntima observada na histologia pulmonar (PRIZON, 2003).

Recentemente, demonstrou-se através da realização de biópsias de pele seqüenciais, efetuadas num mesmo coelho imunizado com colágeno tipo V, que as alterações morfológicas são precoces, surgindo dentro de 15 dias da primeira inoculação (OLIVEIRA, 2005). Este importante resultado sugere que componentes circulantes do colágeno V possam interferir precocemente na função endotelial, antes mesmo do desenvolvimento das reações imunológicas. Adicionalmente, esta disfunção vascular sinalizaria através de citocinas ou outros mediadores, incrementando a síntese de colágenos pelos fibroblastos. Trabalhos recentes sugerem a existência de defeito genético na transdução intra-fibroblasto (“fibroblasto aberrante”), produtor de colágenos estruturalmente anômalos, explicando a origem de fibras estruturalmente defeituosas na esclerodermia (JIMENEZ ET AL, 1996; SHI-WEN ET AL, 1997)

Os dados do nosso projeto confirmam a síntese aumentada do colágeno tipo V no tecido sinovial, com estrutura diferente da habitual, e demonstram que essa anomalia de síntese, encontrada também em pele de animais do modelo (como em pacientes com esclerodermia) é aspecto peculiar e presente em múltiplos órgãos. É possível que, havendo modificação genotípica do fibroblasto (fibroblasto aberrante), induzida pela imunização com colágeno do tipo V, este seria um argumento importante capaz de explicar o surgimento de autoanticorpos (FAN, fator reumatóide, anticorpos anti-colágeno) no presente modelo experimental de DDTC.

Particularidades biológicas do colágeno tipo V como a manutenção dos domínios terminais NH₂ e COOH, porções conhecidamente imunogênicas da molécula de colágeno, parecem ser importantes para a promoção da autoimunidade contra esse tipo de colágeno. Normalmente em condições fisiológicas, essa proteína não fica exposta, estando oculta entre o colágeno dos tipos I e III, compondo as fibras heterotípicas, e presente em diversos tecidos. Este colágeno regula o tamanho, composição e diâmetro das fibrilas heterotípicas, influenciando nas propriedades físicas da matriz fibrosa do mesênquima, sendo localizada em diferentes estruturas, como a membrana basal, vasos, sinóvia, interstício pulmonar, bronquíolos, cartilagem articular hialina, túbulo renal, placenta e tecido conjuntivo que envolve as células musculares lisas das artérias (FICHARD et al,1995; KONOMI et al 1984; LAWRENCE et al, 1994; HAY, 1991; LINSSEN et al 1990).

No presente modelo, admite-se que a imunização prolongada do coelho com colágeno tipo V (duração de dois meses), tenha promovido a exposição de epítomos ocultos deste colágeno (neoantígenos), habitualmente presente na membrana basal ou no interstício na forma de fibras heterotípicas. O processo de imunização teria originado a formação de imunecomplexos circulantes, que ao se depositarem na parede dos vasos, ativariam o sistema complemento, promovendo a destruição da camada endotelial e da membrana basal, expondo os constituintes da matriz mesenquimatosa à ação de anticorpos e mediadores inflamatórios (metaloproteinases), culminando na exposição de epítomos ocultos do colágeno tipo V, perpetuando assim, a reação imuno-inflamatória tecidual. Uma vez que esse colágeno é encontrado distribuído em diferentes tecidos, explicaria o caráter multissistêmico observado no modelo experimental.

Nas doenças reumatológicas, a importância da antigenicidade ao colágeno tem sido demonstrada através da identificação de anticorpos contra os colágenos dos tipos I, II, IV e V nos soros de pacientes com doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC). COLÔNIA, 1997; FUJI et al, 1998; MACKEL et al 1982; RIENT et al 1995). Existe trabalho que sugerem que os anticorpos contra os colágenos tipo IV e V sejam responsáveis pela perpetuação da lesão vascular encontrada nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e vasculites (MORELAND et al, 1991). Anticorpos contra os colágenos tipo I e IV também foram relatados em pacientes com esclerodermia (MACKEL et al 1982) e anticorpos contra o colágeno tipo VII em pacientes com Síndrome de Sjögren (FUJI et al 1998).

Pesquisa realizada no nosso laboratório demonstrou elevadas freqüências de anticorpos contra o colágeno do tipo V nos soros de pacientes com DDTC (COLONIA,1997). Autoanticorpos foram encontrados em 12% (4/31) de pacientes com artrite reumatóide, 18% (6/33) dos pacientes com doença mista do tecido conjuntivo, 42% (13/32) dos pacientes com lupus eritematoso sistêmico, 46.9% (30/64) dos pacientes com esclerose sistêmica e somente 3.2% (1/31) dos controles normais.

De acordo com a nossa proposta de explicação da patogênese do presente modelo experimental, podemos sugerir que em determinadas DDTC, possivelmente na esclerodermia e lúpus eritematoso sistêmico, essas enfermidades teriam o quadro clínico agravado em consequência da presença de anticorpos contra componente do colágeno tipo V.

Embora a etiopatogênese das DDTC seja desconhecida, podemos especular, especialmente em relação a esclerodermia, da existência de ataque inicial dirigido ao endotélio, quer seja via depósito de imunecomplexos com ativação do sistema complemento, quer seja, lesão vascular direta promovido por agentes infecciosos ou substâncias tóxicas. Após lesão persistente da membrana basal, haveria a exposição de antígenos “self” ocultos do colágeno tipo V e anticorpos anti-colágeno V, amplificaria a agressão tecidual aos diferentes órgãos. Assim, anticorpos contra colágenos, particularmente os dirigidos contra os tipos IV e V, teriam importante papel patogênico nestas enfermidades, ao invés de serem considerados apenas epifenômeno.

No presente modelo, pensamos que imunecomplexos ou componentes do colágeno tipo V tenham causado a injúria primária das células endoteliais. Ativação do endotélio, produtos da ativação do sistema complemento, citocinas ou quimocinas liberadas nesse processo inicial, teriam promovido a ativação de fibroblastos e conseqüente remodelamento da matriz extra celular observada na esclerodermia.

Recentemente, estudos experimentais usando modelos de transplante pulmonar têm mostrado que o colágeno do tipo V é um novo antígeno envolvido na rejeição de transplante pulmonar (MARES et al 2000) e a tolerância oral induzida para esse colágeno previne a rejeição aguda (YASUFUKU et al 2001) e crônica (YASUFUKU et al 2002). Devido ao importante papel do colágeno do tipo V na regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno (LINSENMEYER et al, 1991), ligação entre as fibras (WENSTRUP et al, 2004) e interação com outros tipos de colágenos, esta macromolécula exerce uma importante influência sobre a função e arquitetura da matriz extracelular (CHANUT- DELALANDE et al, 2004). Um estudo recente mostrou que este colágeno está envolvido na maior expressão de genes que codificam fatores ligados a apoptose de células mamárias com carcinoma ductal (LUPARELLO et al, 2005).

Provavelmente, citocinas produzidas por células inflamatórias e plaquetas como TGF- β e PDGF, e também produtos de células endoteliais ativadas como prostaciclina, endotelina e tromboxano tenham um papel importante no aumento da síntese de colágeno nos tecidos. Admite-se que, o TGF- β seja o indutor mais potente da síntese do colágeno dos tipos I, III,

V, VI, e VII e da síntese de fibronectina pelos fibroblastos (ADAMS, 1989; BORNSTEIN et al 1989; CZAJA et al, 1987; HOWELL et al, 2001; IHN et al, 2001, NIKKARI et al 1994).

Para explicar o remodelamento da matriz extracelular neste modelo experimental, admite-se a participação de inúmeras citocinas envolvidas no processo de fibrose, produzidas por células inflamatórias e plaquetas, como TGF- β (fator de crescimento transformador β), CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), IL-1, IL-4, IL-6, e produtos derivados de células endoteliais ativadas, como prostaciclina, endotelina e tromboxano (POSTLETHWAITE et al, 1992; DUNCUN AND BERMAN, 1989; DUNCUN AND BERMAN, 1991; WIDON 2000; UNEMORI et al, 1996; COTTON et al, 1998; HIRONOBU et al, 2001; SHIN-WEN et al, 2001; HIRONOBU, 2002).

Outros estudos evidenciam a regulação negativa da produção de colágeno por citocinas antifibróticas como o TNF- α (fator de necrose tumoral α) (GREENWEL et al, 2000; ABRAHAM et al, 2000) e IFN- γ (interferon γ) (GRANSTEIN et al, 1990).

Estudos com fibroblastos isolados de pele de coelhos imunizados com colágeno V, realizados em nosso laboratório, mostraram que essas células encontravam-se ativadas, devido a acelerada multiplicação celular e produção de elevada quantidade de colágeno, confirmando os dados previamente observados em cultura de fibroblastos de pacientes com esclerodermia cultivados “in vitro” (LEROY, 1974; BEZERRA et al, 2005).

Nos tecidos fibróticos encontram-se depositados grandes quantidades de colágenos na matriz extracelular, sendo os componentes fibrilares as proteínas mais abundantes. Entre eles, os colágenos V e XI, localizados no interior das fibras heterotípicas, são os encontrados em menores proporções, contudo, desempenham papel fundamental na preservação da arquitetura da rede de colágeno, além de desempenharem função fundamental na fibrilogênese, determinando o tamanho dessas fibras. Além disso, as moléculas do colágeno do tipo V contribuem para a ligação dos colágenos do estroma com a membrana basal e são importantes na adesão celular e processo de reparação da matriz (FICHARD et al, 1995). Este colágeno, associado aos tipos I e III, contribui na preservação e integridade do tecido conjuntivo presente nos vasos. O aumento da interação entre os diferentes tipos de colágeno e conseqüentemente, a formação de fibras mistas ou heterotípicas, pode influenciar de forma importante na arquitetura e função da matriz extracelular.

Neste modelo de autoimunidade, é possível propor que anticorpos direcionados contra o colágeno V reagiriam com epítomos desta proteína, presentes na matriz, promovendo desorganização tecidual e remodelamento da matriz vascular, com proliferação intimal e oclusão da luz vascular, como a observada na esclerodermia. A síntese de fibrila do colágeno do tipo V com propriedades biológicas anômalas, poderia modificar a interação desse colágeno com as fibras dos tipos I e III, resultando na formação de uma estrutura em placa, semelhante ao observado na esclerodermia.

Neste modelo experimental induzido pelo colágeno V em coelhos, TEODORO et al, 2003 já haviam demonstrado alterações morfológicas em região sinovial e subsinovial, caracterizadas por depósito de colágeno e discreto processo inflamatório, sendo confirmadas pela análise bioquímica.

Além da alteração sinovial, a análise preliminar da cartilagem no presente modelo revelou mudanças na composição de matriz extracelular com aumento no número de condrócitos e agrupamentos anômalos de células (PRIZON, 2003).

Provavelmente, o remodelamento do tecido sinovial às custas de fibrose e vasculopatia, promoveria mudanças nas propriedades bioquímicas do fluido sinovial sintetizado pelos sinoviócitos, comprometendo a nutrição dos condrócitos. Outra explicação para o dano da cartilagem seria decorrente do fato do colágeno do tipo XI, presente na cartilagem, apresentar propriedades estruturais e biológicas semelhantes ao tipo V, além de ambas participarem em processos como crescimento e reparação tecidual (FICHARD et al, 1995; VON DER MARCK et al, 1982). Assim, anticorpos dirigidos contra colágeno tipo V, poderiam reconhecer o colágeno tipo XI, contribuindo na desestruturação do tecido cartilaginoso.

O colágeno do tipo XI é um componente menor da cartilagem articular, localizado no interior das fibrilas heterotípicas e unido covalentemente com o colágeno do tipo II (EYRE et al, 1995; MORRIS et al 1987). Porém, sua integridade parece ser importante para a manutenção das propriedades físicas da matriz cartilaginosa, pois ela está diminuída durante o processo de osteoartrose (VELOSA, 2001). As razões para esta

diminuição são desconhecidas. Além da possibilidade da existência de reação cruzada entre colágeno dos tipos V e XI, devido à sua semelhança molecular e epítomos comuns (FICHARD et al, 1995; VON DER MARCK et al, 1982), pode-se admitir que os condrócitos estejam sintetizando colágeno do tipo XI com características biológicas diferentes, à semelhança do que ocorre com a síntese do colágeno do tipo V no presente modelo.

A descoberta de procedimentos que possam inibir a produção exagerada de proteínas de matriz pelos fibroblastos, poderia constituir em terapêutica das DDTC, que cursam com remodelamento da matriz fibrosa e promovem frequentemente destruição tecidual irreversível (BORDER et al, 1992; IGNOTZ et al, 1986). O presente modelo experimental reproduz esta condição patológica, é bastante exeqüível, pois é realizada em animais saudáveis, além de exibir lesões histológicas e manifestações de autoimunidade encontradas em diversas DDTC, particularmente interessante no estudo da esclerodermia.

Estudos adicionais serão necessários, para esclarecer muitas dúvidas relacionadas à esse modelo original de autoimunidade, oferecendo soluções que poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos patogénéticos, envolvidos nos processos de remodelamento e disfunção da matriz extracelular, observada na maioria das doenças do tecido conjuntivo, além de permitir a realização de ensaios terapêuticos que possam melhorar o prognóstico das DDTC.

CONCLUSÕES

A imunização de coelhos com colágeno do tipo V mais adjuvante de Freund promove progressivo remodelamento sinovial, caracterizado por aumento do colágeno na íntima e subíntima com escasso processo inflamatório celular.

A imunodeteção e a análise bioquímica dos colágenos presentes na sinóvia revelam que animais imunizados com colágeno do tipo V apresentam estatisticamente aumento dos colágenos habitualmente presentes neste tecido, porém em tempos diferentes.

A elevada imunodeteção do colágeno do tipo V no tecido sinovial dos animais imunizados é um achado inusitado, e suas particularidades biológicas, principalmente relacionado à fibrilogênese, explicaria a formação de tecido matricial com propriedades físicas diferentes das habituais.

O modelo experimental obtido em coelhos normais imunizados com colágeno do tipo V humano é original, e reproduz alterações morfológicas sinoviais diferentes das observadas nos modelos de artrite reumatóide, sendo mais semelhantes à esclerodermia, e portanto, importante para a compreensão dos processos patogénéticos e terapêuticos dessa enfermidade.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM DJ; SHIWEN X; BLACK CM; SA S; XU Y; LEASK A. Tumor necrosis factor α suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor- β in normal and scleroderma fibroblasts. **J Biol Chem** 275: 15220-25, 2000

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

ADACHI E, HAYASHI T, HASHIMOTO PH. Immunoelectron microscopical evidence that type V collagen is a fibrillar collagen: Importance for an aggregation capability of the preparation for reconstituting banding fibrils. **Matrix**, 9:232-237, 1989

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

ADACHI E, HOPKINSON I, HAYASHI T. Basement membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. **Int Rev Cytol** 173:73–156,1997

ADAMS SL. Collagen gene expression. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1: 161-5, 1989

BARLAND P, NOVIKOFF AB, HAMERMAN D. Electron microscopy of the human synovial membrane. **J Cell Biol** 14:207-16,1962

BEZERRA MC, TEODORO WR, OLIVEIRA CC, VELOSA APP, OGIDO LTI, CARRASCO S, GAUDITANO G, CAPELOZZI VL, YOSHINARI NH. Collagen type V induces cutaneous remodeling in rabbits similar to systemic sclerosis (enviado para publicação. Em avaliação)

BILLIGHAM MEJ, Adjuvant arthritis: the first model. In HENDERSON B, EDWARDS JCW, PETTIPHER ER, eds. Mechanisms and models in rheumatoid arthritis. London: Academic Press; 389-410, 1995

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

BORNSTEIN P, SAGE H. Regulation of collagen gene expression. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol** 37: 67-73,1989

BRACKERTZ D, MITCHELL GF, MACKAY IR. Antigen-induced arthritis in mice I. Induction of arthritis in various strains of mice. **Arthritis Rheum.** 20: 841-50, 1977

CHANUT- DELALANDE H, BONOD-BIDAUD C, COGNE S, MALBOUYRES M, RAMIREZ F, FICHARD A, RUGGIERO F. Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. **Mol Cell Biol** 24: 6049-57, 2004

CHUNG E, RHODES RK, MILLER E. Isolation of th collagenosis components to probable membrane origin from several tissues. **Biochem Biophys Res Commun.** , 71:1167-74, 1976

COLONIA AMN. Determinação do anticorpo anti-colágeno V na esclerodermia. p148. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo,1997

COTTON SA, HERRICK AL, JAYSON MIV, FREEMONT A. TGF- β - A role in Systemic Sclerosis. **J Pathol** 184: 4-6, 1998

COURTENAY JS, DALLMAN MJ, DAYAN AD, MARTIN A, MOSEDALE B.
Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice.
Nature 283:666–8,1980

CREMER MA, ROSLONIEC EF 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

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

DRAZEN JM, GILL GN, GRIGGS RC, KOKKO JP, MANDELL GL, POWELL
DW, SCHAFER AI. Musculoskeletal and connective tissue diseases. In:
Rosenwasser, LJ. The Vasculitic Syndromes. Textbook of Medicine.21 Ed.
Philadelphia. Toronto, London&Sydney, 2000, p1524-7

DUNCUN MR, BERMAN B. Differential regulation of collagen,
glycosaminoglycan, fibronectin and collagenase activity production in
cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin 1- α and β and tumor
necrosis factor- α and β . **J Invest Dermatol** 92: 699-706, 1989

DUCUN MR, BERMAN B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in culture human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. **J Invest Dermatol** 97: 686-92, 1991

EDWARDS JCW, WILKINSON IS. Immunohistochemistry of synovium. In HENDERSON V, EDWARDS JCW, PETTIFER ER, eds. Mechanisms and models in rheumatoid arthritis. New york: Academic Press. 133-150,1995

EYRE DR, WU JJ. Collagen structure and cartilage matrix integrity. **J Rheumatol** 22: 82-4, 1995

FESSLER JH, FESSLER LI, Type V Collagen. In: Structure and Function of Collagen Types. Mayne R and Burgeson RE Eds. Academic Press, Orlando, pp 81-103,1987

FICHARD A, KLEMAN JP, RUGGIERO F. Another look at collagen V and XI molecules. **Matrix Biol.**14 (7): 515-31,1995

FUJI K, FUJIMOTO W, UEDA M, MAKINO E, ARATA J. Detection of anti-type VII collagen antibody in Sjogren's syndrome/ lupus erythematosus overlap syndrome with transient bullous systemic lupus erythematosus. **Br. J. Dermatol.**139 (2):302-6, 1998.

GALLAGHER PJ, ANDERSON JR. Histopathological diagnosis. In: Oxford Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology 13th ed. Vol 1. 4.10: 456-7,1993

GARRONE R, LETHIAS C, LE GUELLEC D. Distribution of minor collagens during skin development. **Microsc Res Tech** Aug 15;38(4):407-12,1997

GRANSTEIN RD, FLOTTE TJ, AMENTO EP. Interferons and collagen production. **J Invest Dermatol** 95(suppl): 75S-80S, 1990

GREENWEL P, TANAKA S, PENKOV D, ET AL. Tumor necrosis factor alpha inhibits type I collagen synthesis through repressive CCAAT/enhancer-binding proteins. **Mol Cell Biol** 20: 912-18, 2000

HAY ED. Matrix assembly. In: Hay ED (Eds) *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 20th ed., pp 221–249. Plenum, New York,1991

HERMAN A, KAPPLER JW, MARRACK P, PULLEN AM. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. **Ann Rev Immunol.** 9:745-72,1991

HIRONOBU I; KENICHI Y; MASAHAIDE T; KUNIIHIKO T. Blockade of endogenous transforming growth factor [beta] signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: Association with increased expression of transforming factor [beta] receptors. **Arthritis and Rheum** 44: 474-80, 2001

HIRONOBU I. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- β and CTGF. **Curr Opin Rheumatol** 14: 681-85, 2002

HOLMDAHL R, ANDERSSON M, ENANDER I, ET AL. Nature of the type II collagen autoimmunity in mice susceptible to collagen-induced arthritis. **Int. Rev Immunol.** 4:49-64,1988

HOLMDAHL R, ANDERSSON M, GOLDSCHMIDT TJ, GUSTAFSSON K, JANSSON L, MO JA. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. **Immunol Rev.**118:193-232,1990

HOLOSHITZ J, MATITIAU A, COHEN IR. Arthritis induced in rats by cloned T lymphocytes responsive to mycobacteria but not to collagen type II. **J Clin Invest** 73:211-5,1984

HOWELL DC, PELLETIER JP. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: McCarthy DJ; Koopman WJ.(14th Eds) Arthritis and Allied Conditions. A

Textbook of Rheumatology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, London. 2195-215, 2001

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

IGNOTZ R, MASSAGUE J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. **J Biol Chem** 261: 4337-43,1986

IHN H, YAMANE K, KUBO M, TAMAKI K. Blockage endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up- regulated collagen synthesis in scleroma fibroblasts association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. **Arthritis Rheum** 44: 474-80, 2001

INKINEN K, TURAKAINEN H, WOLFF H, AHONEN J. Cloning of cDNA for Rat Pro $\alpha 1(V)$ Collagen mRNA. Expression patterns of type I, type III and type V collagen genes in experimental granulation tissue. **Connect Tissue Res** 40(3): 209-20, 1999

KEMPT JD, MADRI JA. The immune response to human type II and type V(AB2) collagen: antigenic determinants and genetic control in mice. **J Immunol** 11 (2): 90–94,1981

KEY JA. The synovial membrane of joints and bursae. In: Special cytology, vol 2. New York: PB Hoeber Inc 1055-76,1932

KLARESKOG L, HOLMDAHL R, GOLDSCHMIDT T, BJÖRK J. Immunoregulation in arthritis. A review on synovial immune reactions in RA and in some experimental animal models for arthritis. **Scand J Rheumatol.** 64:7–15,1987

JIMENEZ SA, HITRAYA E, VARGA J. Pathogenesis of scleroderma. Collagen. **Rheum Dis Clin North Am.** 22(4):647-74, 1996

KLEINAU S, ERLANDSSON H, HOLMDAHL R, KLARESKOG L. Adjuvant oil s induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of disease and evidence for an immunological involvement. **J. Autoimmun.** 4:871-80,1991

KLIPPEL JA, DIEPPE PA, Rheumatoid Arthritis and others synovial disorders : in Rheumatology,2nd ed. 1998

KOGA T, KAKIMOTO K, HIROFUJI T et al. Acute joint inflammation in mice after systemic injection of the cell wall, its peptidoglycan, and chemically bacteria. **Infect Immun.** 50:27-34,1985

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

KRANE SM, GOLDRING SR, DAYER JM. Interactions among lymphocytes, monocytes and other synovial cells in the rheumatoid synovium. **Lymphokines** 5-87,1982

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

LAWRENCE R, HARTMANN D J, SONENSHEIN GE. Transforming growth factor beta 1 stimulates type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.** 269 (13): 9603-9, 1994.

LEROY EC. Systemic sclerosis (scleroderma). In: Bennett JC & Plum F (20th Ed) Cecil Textbook of Medicine, p 1483-9, WB Saunders Company, Philadelphia, PA, 1996

LEROY EC Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: A possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. **J Clin Invest** 54; 880-9,1974

LINSENMAYER TF, FITCH JM, BIRK DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens: Controlling elements in corneal morphogenesis. **Ann NY Acad Sci** 580: 143-60,1990

LINSENMAYER TF. Collagen. In: Hay, ED. Biology of Extracellular Matrix, 2^a Ed. New York, Plenum Press, Ed Cell 7- 43,1991

LINSENMAYER TF, GIBNEY E, IGO EF, GORDON MK, FITCH JM, FESSLER L, BIRK DE. Type V collagen: Molecular structure and fibrillar organization of the chicken $\alpha 1(V)$ NH2 terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. **J Cell Biol** 121:1181-1189,1993.

LUPARELLO C, SIRCHIA R. Type V collagen regulates the expression of apoptotic and stress response genes by breast cancer cell. **J Cell Physiol** 202: 411-21,2005

LUROSS, JA, WILLIAMS NA, The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis (Review). **Immunology** 102,407-16,2001

MACKEL AM, DELUSTRO F, HARPER FE, LEROY EC. Antibodies to collagen in scleroderma. **Arthritis Rheum** 25 (5): 522-31,1982

MARES DC, HEIDLER KM, SMITH GN JR, CUMMINGS OW, HARRIS ER, FORESMAN B, WILKES DS. Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. **Am J Respir Cell Mol Biol** 23: 62-70,2000

MAYNE R, BURGESSON R Structure and function of collagen types. In: Uleham R (Ed) *Biology of Extracellular Matrix*, 20th ed., Academic Press, London 1-37,1993

MIZUNO K, ADACHI E, IAMAMURA Y, KATSUAMTA O HAYASHI T. The fibril structure of type V collagen triple-helical domain. **Micron**, 32(3);317-23, 2001

MORELAND LW, GAY RE, GAY S. Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol Immunopathol** 60: 412-418,1991

MORRIS NP, BACHINGER HP. Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (alpha1, alpha2 and alpha3) retaining none-triple helical domains. **J Biol** 262:11345-50,1987

NATOUR J, MONTEZZO, LC, MOURA LA, ATRA E. A study of synovial membrane of patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol** 09: 221-5,1991

NIKKARI ST, JARVELAINEN HT, WIGHT TN, FERGUSON M, CLOWES AW Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. **Am J Pathol** 144: 1348-56,1994

NIYIBIZI C, FIETZEK PP, REST VM. Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$. **Col Mol** 259: 14170-174,1984

NIYIBIZI C, EYRE DR. Structural analysis of the extension peptides on matrix forms of type V collagen in fetal calf bone and skin. **Biochem Biophys Acta** 1203:304-309, 1993

NIYIBIZI C, EYRE DR. Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. **Eur J Biochem** 15;224(3):943-50, 1994

OLIVEIRA CC, 2005. Avaliação seqüencial da pele de coelhos imunizados com colágeno do tipo V. Monografia apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas, 2005

PATTI JM, BREMELL T, KRAJEWSKA-PIETRASIK D, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesion is a virulence determinant in experimental septic arthritis. **Infect Immun.** 62:152-61,1994

POSTLETHWAITE AE, HOLNESS MA, KETAI H ET AL. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix protein in response to interleukin 4. **J Clin Invest** 90: 1479-85, 1992

PRIZON CC. Análise morfológica e padronização da cultura de miofibroblastos das artérias pulmonares em modelo experimental de doença difusa do tecido conjuntivo induzida pelo colágeno do tipo V. Monografia apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas, 2003

RIENT A, DOLCHER MPP, BOMBARDIERI SMP. Anticollagen antibodies in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. **Clin Exp Immunol** 102: 354-9, 1995

SAGE H, BORNSTEIN P. Type VIII collagen in: Structure and Function of Collagen Types, Academic Press, New York, p 173-193, 1979

SHI-WEN X, DENTON CP, MCWHIRTER A, BOU-GHARIOS G, ABRAHAM DJ, DU BOIS RM, BLACK CM. Scleroderma lung fibroblasts exhibit elevated and dysregulated type I collagen biosynthesis. **Arthritis Rheum.** 1997 Jul;40(7):1237-44.

SHI-WEN X, DENTON CP, DASHWOOD MR, HOLMES AM, BOUGHARIOS G, PEARSON JD, BLACK CM, ABRAHAM DJ. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: Role of endotelin-1. **Dermatol** 116: 417-25, 2001

STUART JM, TOWNES AS, KANG AH. Nature and specificity of the immune response to collagen in type II collagen - induced arthritis in mice. **J Clin Invest.** 69:673-83,1982

TEODORO WR. Imunogenicidade ao colágeno do tipo V em coelhos: um novo modelo experimental para o estudo da patogênese da vasculite de hipersensibilidade autoimune. 113pag. Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo,2001

TEODORO WR, MIRON BG, OGIDO LT, VELOSA AP, ABATEPAULO F, CAPELOZZI VL, YOSHINARI NH Synovial remodelling process induced by type V collagen immunization in rabbits. **Pathol Res Pract** 199:605-612,2003

TEODORO WR, VELOSA AP, WITZEL SS, GARIPPO AL, FARHAT C, E PARRA, SONOHARA S, CAPELOZZI VL, YOSHINARI NH Architectural remodelling in lung rabbits induced by type V collagen immunization: a

preliminary morphological model to study diffuse connective tissue diseases

Pathol Res Pract 200: 681-91, 2004

TRENTAM DE, TOWNES AS, KANG AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. **J Exp Med** 146:857-68,1977

UNEMORI EN, AMENTO EP. Connective tissue metabolism in scleroderma, including Cytokines. **Curr Opin Rheumatol** 8: 580-84, 1996

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

VAN EDEN W, HOGERVORST EJ, HENSEN EJ, ET AL. A cartilage-mimicking T-cell epitope on a 65k mycobacterial heat-shock protein: adjuvant arthritis as a model for human rheumatoid arthritis. **Curr Topics Microbiol Immunol.** 145:27-43, 1989

VELOSA APP. Importância dos colágenos IX e XI na progressão da osteoartrose experimental em coelhos. 127pag. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001

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

WALSH DA, SLEDGE CB, BLAKE DR, Biology of the normal joint. In: Textbook of Rheumatology , KELLEY WN, HARRIS,ED, RUDY S, SLEDGE CB EDS. 5^a Ed. Vol 1. 1-22, 1997

WENSTRUP RJ, FLORER JB, BRUNSKILL EW, BELL SM, CHERVONEVA I, BIRK DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. **J Biol Chem** 279: 53331-7,2004

WIDOM RL. Regulation of matrix biosynthesis and degradation in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 12: 534-39, 2000

WILKERSON MJ, DAVIS WC, BASZLER TV, CHEEVERS WP. Immunopathology of chronic lentivirus-induced arthritis. **Am J Pathol** 146:1433-43,1995

WOOLEY PH, SEIBOLD JR, WHALEN JD, CHAPDELAINE JM. Pristane-induced arthritis. The immunological and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. **Arthritis Rheum.**32:1022-30,1989

WOOLEY PH Animal models of arthritis. In: Klippel JH, Dieppe PA (Eds) Rheumatology, 2nd ed., Section 5.8.1. Harcourt Publishers Limited, London,1998

YASUFUKU K, HEIDLER KM, O'DONNELL PW, SMITH GN JR, CUMMINGS OW, FORESMAN BH, FUGISAWA T, WILKES DS. Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection. **Am J Respir Cell Mol Biol** 25: 26-34,2001

YASUFUKU K, HEIDLER KM, WOODS KA, SMITH GN JR, CUMMINGS OW, FUGISAWA T, WILKES DS. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by type V collagen-induced oral tolerance. **Transplantation** 73: 500-05,2002

YOSHINARI NH, TEODORO WR, OGIDO LT, VELOSA AP, PRIZON CC, MIRON B, BISSOLI JCL, CUENTAS ERP, CAPELOZZI VL. Modelo experimental de doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) induzido por colágeno do tipo V. **Rev Bras Reumatol** 42:295-305,2002