

Mailze Campos Bezerra

**Remodelamento da pele semelhante à  
esclerodermia induzido pelo colágeno tipo V**

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

Área de Concentração: Reumatologia  
Orientador: Prof. Dr. Natalino Hajime  
Yoshinari

**São Paulo  
2007**

**Este trabalho foi realizado no laboratório de matriz extracelular da Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.**

**Dedico este trabalho ao meu esposo  
Reginaldo, pelo carinho e compreensão ao  
longo desta caminhada e à nossa filha,  
Isabella, nosso amor eterno!**

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao **Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari**, meu orientador, agradeço pelo carinho e atenção em cada passo do meu aprendizado. Obrigada por ter me apresentado ao laboratório de pesquisa experimental, que foi decisivo para o meu crescimento profissional.

À **Dra. Walcy Rosolia Teodoro**, um agradecimento todo especial por sua presença constante, paciência pra resolver cada dificuldade, pela maneira carinhosa e alegre de ser. Com certeza, ficarão na memória os momentos descontraídos que passamos juntas. Muito obrigada pela sua amizade.

Às amigas do laboratório, **Cristiane, Paula e Luciana**, obrigada pelo suporte técnico e emocional no decorrer desses anos de alegre convívio. Vocês são lembranças muito felizes de uma época inesquecível.

À **Prof. Dra. Vera Luiza Capelozzi**, agradeço pelas orientações histopatológicas necessárias para a realização desse trabalho.

À **Prof. Dra. Eloísa Silva Dutra Bonfá**, agradeço pela oportunidade do doutorado e por todos os ensinamentos transmitidos durante a residência de Reumatologia e pós-graduação.

A todos os **Assistentes**, obrigada pelos ensinamentos particulares em cada área da Reumatologia. Aprendi muito com vocês.

Às secretárias da Reumatologia, **Cláudia, Fátima, Marta e Iná**, obrigada pelo apoio em todos esses anos de aprendizado.

Aos colegas da turma 2000-2001, **Jozélio, Francisco Saraiva, José Roberto, Júlio César, Kátia e Karla**, obrigada pelos momentos felizes compartilhados na Residência Médica.

Aos meus queridos pais, **Odalze e Tibúrcio**, agradeço pela contínua educação que me proporcionaram, pela confiança e incentivo em todas as ocasiões, sobretudo quando decidi ficar distante da família, para fazer residência médica, vocês sempre me apoiaram. Obrigada por todo amor e carinho.

Aos meus irmãos, **Marília, Manoela, Denize e Jardel**, obrigada pela amizade, carinho e pelos momentos felizes compartilhados.

## **SUMÁRIO**

---

## SUMÁRIO

Lista de siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>3. MÉTODOS</b>	<b>8</b>
3.1. Imunização dos coelhos com colágeno tipo V	9
3.2. Pacientes	10
3.3. Imunodeteção do colágeno	10
3.4. Análise morfométrica	12
3.5. Escore da imunofluorescência	12
3.6. Análise estatística	12
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>13</b>
4.1. Análise histológica	14
4.2. Análise imunohistoquímica	16
4.3. Análise morfométrica	19
4.4. Escore da imunofluorescência	20
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>22</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>32</b>



<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>34</b>
<b>8. APÊNDICES</b>	<b>39</b>

**LISTAS**

---

## LISTA DE SIGLAS

ANA	Anticorpos antinucleares
Anti-Scl-70	Anticorpo anti-topoisomerase I
APP	Anexos
COL	Colágeno
COL I	Colágeno tipo I
COL II	Colágeno tipo II
COL III	Colágeno tipo III
COL V	Colágeno tipo V
CT	Tecido conjuntivo
COOH	Grupo Carboxila
Epi	Epiderme
IMF	Imunofluorescência
MEC	Matriz extracelular
NH <sub>2</sub>	Grupo amino
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral beta
TSK mouse	Tight skin mouse

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Painéis A-F:** Pele de coelhos controles e imunizados corada com tricrômico de Masson. **A**-coelho controle 7 dias, **B**-coelho imunizado 7 dias, **C**-coelho controle 75 dias, **D**-coelho imunizado 75 dias, **E**-coelho controle 120 dias, **F**-coelho imunizado 120 dias. **Painéis G-H:** Pele humana normal e de esclerodermia corada com tricrômico de Masson. **G**-normal, **H**-esclerodermia. (Aumento: 400X); Epi-epiderme; APP-anexos; Col-Colágeno; CT-tecido conjuntivo. 15
- Figura 2 - Painéis A-F:** IMF da pele de coelhos controles e imunizados após 75 e 120 dias da imunização, marcada com anticólageno tipo I. **A**-coelho controle 75 dias, **B**-coelho imunizado 75 dias, **C**-coelho controle 120 dias, **D**-coelho imunizado 120 dias, **E**-coelho controle 120 dias, **F**-coelho imunizado 120 dias. **Painéis G-H:** Pele humana normal e esclerodérmica marcada com anticólageno I por IMF. **G**-pele normal, **H**-esclerodermia. (Aumento: 100X painéis A-D, G-H; 200X em painéis E-F) Epi-epiderme; APP-anexos; Col I-colágeno tipo I. 17
- Figura 3 - Paineis A-H:** IMF da pele de coelhos controles e imunizados e pele humana normal e esclerodérmica marcada com anti-colágeno tipo III (**A-D**) e V (**E-H**). **A**-coelho controle 120 dias, **B**-coelho imunizado 120 dias, **C**-pele normal, **D**-pele esclerodérmica. **E**-coelho controle 120 dias, **F**-coelho imunizado 120 dias, **G**-pele normal, **H**-esclerodermia (Aumento: 100X em A-H) Epi- epiderme; APP- anexos; Col III-colágeno tipo III; Col V- colágeno tipo V. 18

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>		19
	Comparação do depósito total de colágeno nos animais controles e imunizados de 75 dias	
<b>Tabela 2 -</b>		19
	Comparação do depósito total de colágeno nos animais controles e imunizados de 120 dias	
<b>Tabela 3 -</b>		20
	Escore da imunofluorescência dos colágenos tipo I, III e V do grupo imune e controle após 75 dias da imunização	
<b>Tabela 4 -</b>		21
	Escore da imunofluorescência dos colágenos tipo I, III e V do grupo imune e controle após 120 dias da imunização	

**RESUMO**

---

## RESUMO

Bezerra MC. Remodelamento da pele semelhante à esclerodermia induzido pelo colágeno tipo V [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Recentemente, descobrimos que coelhos, Nova Zelândia, imunizados com colágeno tipo V humano mais adjuvante de Freund apresentavam fibrose e vasculite de órgãos normalmente afetados na esclerose sistêmica. Deste modo, nós estudamos o processo de fibrilogênese para identificar possíveis fatores envolvidos na alteração do remodelamento observado neste modelo de esclerodermia. Adicionalmente, fizemos uma comparação preliminar com pele humana obtida de pacientes com esclerodermia (n=3). Coelhos fêmeas, Nova Zelândia (n=14), foram imunizados subcutaneamente com duas doses de 1mg de colágeno V mais adjuvante completo de Freund, com intervalo de 30 dias, seguido de duas imunizações em adjuvante incompleto de Freund, via intramuscular, com intervalo de 15 dias. Os animais do grupo controle (n=14) foram inoculados somente com adjuvante completo e incompleto de Freund, nas mesmas condições dos imunizados. Foram realizadas análises histológicas das peles dos animais e pacientes através da coloração com tricrômico de Masson e imunofluorescência, a fim de detectar fibras de colágeno e interação dos colágenos I, III e V. A análise da pele dos animais demonstrou depósito precoce de fibras de colágeno na derme após 7 dias da sensibilização, com aumento destes depósitos após 75 e 120 dias respectivamente. Depósito de colágeno na pele e atrofia de anexos foram mais intensos nos animais sacrificados em 120 dias e se correlacionaram com a quantidade aumentada de colágeno. Surpreendentemente, o colágeno V foi expresso em animais e pacientes, formando fibras densas e atípicas na derme. Sugerimos que esta expressão anômala de colágeno V, morfológicamente diferente, possa justificar o remodelamento observado na placa esclerodérmica.

Palavras-chave: Esclerodermia, esclerose sistêmica, fibrilogênese, remodelamento da matriz extracelular, colágeno tipo V, modelo experimental.

## **SUMMARY**

---



## SUMMARY

Bezerra MC. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2007.

Recently, we discovered that New Zealand rabbits immunized with human type V collagen plus Freund's adjuvant presented fibrosis and vasculitis of organs usually affected in systemic sclerosis. In this way, we studied the fibrillogenesis process regarding to identify any possible factor involved in altered remodeling observed in this scleroderma-like model. Additionally, we done a very preliminary comparison with human skins obtained from scleroderma patients (N=3). Female New Zealand rabbits (N=14) were immunized subcutaneously with two doses of 1mg collagen V plus complete Freund's adjuvant at a 30 days interval, followed by two additional intramuscular booster immunizations in incomplete Freund's adjuvant at a 15-day interval. Animals from control group (N=14), were only inoculated with complete and incomplete Freund's adjuvant given at same conditions of collagen type V group. Histological analysis of skins from animals and patients were done by Masson's trichrome staining, and immunofluorescence method used to detect collagen fibers and interactions of types I, III and V collagen in the remodeling process. The analysis of animal skins showed precocious collagen fibril deposits in the dermis after 7 days of immunization and increase of this process in 75 and 120 days. Skin collagen deposit and atrophy of annexes were progressively more intense in late sacrificed animals and correlated with increased amount of collagen deposition. Surprisingly, type V collagen was over expressed both in animals and patients, forming dense and atypical collagen fibers in the dermis. We suggest that this anomalous expression of morphologically different type V collagen could justify the remodeling observed in scleroderma plaque.

Keywords: Scleroderma, systemic sclerosis, fibrillogenesis, extracellular matrix remodeling, type V collagen, experimental model.

## **1- INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica ou esclerodermia é doença autoimune de etiologia desconhecida, caracterizada pelo depósito de matriz extracelular e sua patogênese é pouco conhecida. Fatores genéticos, ambientais, imunológicos e atualmente o microquimerismo fetal sugerem estar envolvidos no desencadeamento desta enfermidade<sup>1</sup>. Alterações morfológicas típicas incluem a lesão endotelial e fibrose progressiva, causando disfunção de muitos órgãos. A pele é normalmente comprometida e o remodelamento da sua arquitetura envolve inter-relações complexas e dinâmicas entre mecanismos imunes efetores e os constituintes da matriz extracelular<sup>2-4</sup>. Sabe-se que três tipos de células estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento das manifestações clínicas e patológicas da doença: fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico, particularmente linfócitos B e T. A disfunção vascular é uma das primeiras manifestações da esclerodermia e pode representar o evento inicial na patogênese da doença.

Modelos animais são utilizados para o estudo da patogênese da esclerodermia e teste de novas drogas terapêuticas. Entretanto, nenhum modelo experimental descrito até o momento reproduziu todas as alterações morfológicas e imunológicas observadas em pacientes com esclerodermia<sup>5</sup>. Stastny *et al*, em 1963, descreveu um modelo de esclerodermia em ratos, *Sprague-Dawley*, previamente imunizados com injeção intraperitoneal de

células linfóides alogênicas <sup>6</sup>. Os animais desenvolveram uma resposta enxerto versus hospedeiro denominada doença homóloga, com dermatite grave, infiltrado inflamatório, atrofia de anexos e fibrose da derme. Porém, alguns aspectos deste modelo, como alteração hematológica e vasculite, não são típicos da esclerodermia. O modelo *tight skin mouse* (TSK-mouse) reproduziu alterações cutâneas e presença de autoanticorpos (anti-Scl-70 e anti-RNA polimerase) encontrados na esclerodermia, porém não apresentou alteração inflamatória nem comprometimento vascular, e a doença ocorreu em animais geneticamente modificados <sup>7-9</sup>.

Gershwin et al, em 1981, descreveu o surgimento espontâneo de fibrose cutânea e de órgãos internos em galinhas de pernas brancas <sup>10</sup>. Entretanto, este modelo experimental evidenciou um intenso processo inflamatório agudo, hipertrofia muscular e glomerulonefrite, não usuais na esclerodermia. Além do mais, ele foi desenvolvido em aves, tornando difícil a comparação com a doença humana. Recentemente, um modelo modificado de enxerto versus hospedeiro foi publicado. Ele reproduziu muitas características histológicas e imunológicas da esclerodermia, mas foi reportado em ratos imunodeficientes <sup>11</sup>.

Nós descobrimos um novo modelo experimental de esclerodermia induzido em coelhos saudáveis, Nova Zelândia, após a imunização destes animais com colágeno humano tipo V mais adjuvante de Freund <sup>12-14</sup>. Os animais desenvolveram fibrose progressiva e vasculite de órgãos normalmente afetados na esclerodermia, incluindo a pele, esôfago, coração, sinóvia, cartilagem e rim. Além disso, a análise do soro obtida dos animais

imunizados revelou o surgimento de autoanticorpos demonstrados pela presença de anticorpos antinucleares circulantes (ANA), anticolágenos tipo I e III, imunocomplexos e anticorpos direcionados contra centríolo e componentes de Golgi (dados não publicados). Os Animais imunizados somente com adjuvante de Freund, ou associado à albumina bovina, não apresentaram alteração semelhante à esclerodermia.

A razão pela qual os coelhos desenvolveram manifestações semelhantes à esclerodermia, após a imunização com colágeno tipo V, ainda não está entendida. Normalmente, este colágeno é encontrado escondido, compondo fibras heterotípicas com colágenos tipo I e III, e também é detectado na membrana basal, contribuindo para a conexão da camada de células endoteliais com componentes da matriz extracelular <sup>15,16</sup>. Esta proteína é encontrada em diferentes membranas basais, sinóvia, cartilagem hialina, placenta e células musculares lisas vasculares. Algumas particularidades tornam o colágeno tipo V diferente dos outros tipos de colágeno. Esta molécula mantém os domínios terminais NH<sub>2</sub> e COOH tornando-a mais imunogênica <sup>17</sup>.

Recentemente, o colágeno tipo V correlacionou-se com rejeição de pulmão, em modelo experimental de transplante alogênico em ratos <sup>18,19</sup>. Foi demonstrado que fragmentos do colágeno V, previamente ocultos, mas expostos durante o processo inflamatório pós transplante, eram os responsáveis pela rejeição. Estes neoantígenos estimulariam o sistema imunológico a gerar linfócitos T citotóxicos, levando a destruição do órgão transplantado. Adicionalmente, a indução da tolerância oral com colágeno

tipo V, foi capaz de prevenir a rejeição, impedindo o surgimento da bronquiolite obliterante, principal causa de morte em humanos e ratos que recebem este tipo de transplante<sup>20,21</sup>.

Nós acreditamos que a imunização com o colágeno tipo V possa promover alterações semelhantes à esclerodermia em coelhos, devido a dois mecanismos diferentes: Epítomos circulantes de colágeno tipo V ativariam diretamente as células endoteliais, via receptores de colágeno tipo V localizados na superfície destas células. Outra possibilidade seria o depósito de imunocomplexos (epítomos de colágeno tipo V e anticorpos correspondentes) e ativação do complemento, com recrutamento de células inflamatórias, causando lesão de células endoteliais e membrana basal. Células endoteliais ativadas liberariam endotelina, enquanto células inflamatórias, macrófagos e linfócitos liberariam citocinas pró-fibróticas (TGF- $\beta$ , PDGF), levando à ativação de fibroblastos com aumento da síntese dos componentes da matriz extracelular. Finalmente, a persistência da injúria prolongada da membrana basal e componentes matriciais levaria a exposição de epítomos ocultos de colágeno tipo V, gerando neoantígenos e originando o modelo experimental de doença autoimune.

## **2 - OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi estudar o processo de remodelamento cutâneo, no modelo experimental de esclerodermia, induzido pelo colágeno tipo V, através da análise dos colágenos tipo I, III e V, e comparar de forma preliminar, achados morfológicos cutâneos observados nestes coelhos imunizados com a esclerodermia humana através da:

- Avaliação morfológica da pele dos animais e pacientes através do tricrômico de Masson.
- Avaliação imunohistoquímica da pele dos animais e pacientes através da imunofluorescência indireta, com anti-colágeno tipos I, III e V.
- Avaliação morfométrica da pele dos animais controles e imunizados.



## **3 - MÉTODOS**

---

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Imunização dos coelhos com colágeno tipo V**

Coelhos fêmeas, Nova Zelândia (N=14), foram imunizados por via subcutânea, com injeção de 1mg de colágeno V isolado de placenta humana, extraído por precipitação com cloreto de sódio<sup>22</sup>, diluído em 1 ml de ácido acético 10mM, adicionado a igual volume de adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA). Após quatro semanas, uma dose idêntica do colágeno tipo V foi administrada aos coelhos, e dois reforços foram realizados em intervalo de 15 dias (1mg de colágeno tipo V mais adjuvante incompleto de Freund), por via intramuscular. O grupo imunizado foi comparado ao grupo controle (N=14) inoculado com adjuvante completo e incompleto de Freund, diluído em ácido acético 10mM, de maneira similar a utilizada para a imunização com colágeno V. Os animais dos dois grupos apresentavam a mesma idade, com peso médio 2500 g. Cada animal foi submetido a biópsia de pele realizada na região dorsal, após anestesia local. Três biópsias, cada uma feita em região distinta, foram realizadas em todos os coelhos após 7, 75 e 120 dias da imunização. As amostras coletadas foram imersas em formol a 10% por 24 horas, embebidas em parafina, seccionadas em cortes de 3 a 4 µm e coradas com tricrômico de Masson. Estas amostras foram igualmente processadas para análise morfológica.

### 3.2. Pacientes

Foram obtidas biópsias de pele de três pacientes com esclerodermia. Uma paciente de 48 anos teve história de fenômeno de Raynaud, esclerodactilia, alteração esofágica e telangiectasia há 20 anos, sendo diagnosticada como CREST. Ela iniciou tratamento com D-penicilamina (DPA) 15 dias antes da biópsia, quando foi vista por reumatologista do nosso serviço. Dois pacientes, um masculino de 49 anos e outro feminino com 40 anos, tiveram diagnóstico de esclerodermia localizada (*en coupe de sabre* e placas), com doença iniciada há 10 anos e 1,5 anos respectivamente. O paciente com *coupe de sabre* estava sem droga de base há 8 anos, e a paciente com esclerodermia em placas não tinha usado nenhuma droga imunossupressora. Fragmentos de pele normal foram obtidos de uma paciente hígida, após cirurgia plástica e utilizados como controle. As amostras de pele foram imersas em formol a 10% por 24 horas, embebidas em parafina e processadas para os mesmos procedimentos histológicos descritos para os coelhos.

### 3.3. Imunodeteção do colágeno

A imunofluorescência das amostras de pele dos animais e dos pacientes com esclerodermia foi feita em fragmentos imersos em parafina, montados em lâminas com aminosilane (Sigma Chemical Co; St. Louis, Missouri, USA), para caracterização do colágeno. As lâminas foram imersas

em xylol e desidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Para a exposição dos sítios imunogênicos, realizou-se o tratamento enzimático da pele com pepsina bovina (10,000 UTD; Sigma Co; St. Louis, Missouri, USA), em tampão ácido, pH=2.2, 2 mg/ml por 30 min a 37°C e incubação posterior com leite desnatado a 5% em tampão fosfato pH=7,0. As lâminas foram incubadas por uma noite, a 4°C, com anti-colágeno tipos I e V policlonais obtidos em camundongos, diluídos em tampão salino fosfato (PBS), ambos nas concentrações de 1:25<sup>13</sup> e anti-colágeno tipo III monoclonal (Oncogen; San Diego, USA), na concentração de 1:100. Para os fragmentos obtidos de pele humana, foram utilizados anti-colágeno tipos I e V diluídos 1:200 e 1:1000 respectivamente e anti-colágeno tipo III diluído 1:1000. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS com tween20 a 0,05%, várias vezes, e incubadas com anticorpo secundário anti Ig G de camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma Chemical Co.), diluído na proporção de 1:50, em solução de PBS contendo azul de Evans 0,005%, por 90 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas por várias vezes com PBS com Tween20 a 0,05% e montadas com solução de glicerina tamponada. A reação foi visualizada em microscópio de fluorescência marca Nikon.

### **3.4. Análise morfométrica**

Lâminas da pele dos animais, coradas pelo Sirius red, foram analisadas em microscópio equipado com polarizador de luz acoplado a um analisador de imagem. Através de um sistema digital as imagens foram processadas para um monitor. Foram selecionados dez campos aleatórios incluindo: epiderme, derme superficial e profunda, sob um aumento de 400x e o colágeno total foi quantificado.

### **3.5. Escore da imunofluorescência**

Foi quantificado o escore de imunofluorescência, na pele dos animais, através da percentagem do acometimento cutâneo, da seguinte forma:

- + : 20% de acometimento cutâneo
- ++: 40% de acometimento cutâneo
- +++: 60% de acometimento cutâneo
- ++++: 80% de acometimento cutâneo
- +++++: 100% de acometimento cutâneo

### **3.6. Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o teste T - Student, programa SPSS.

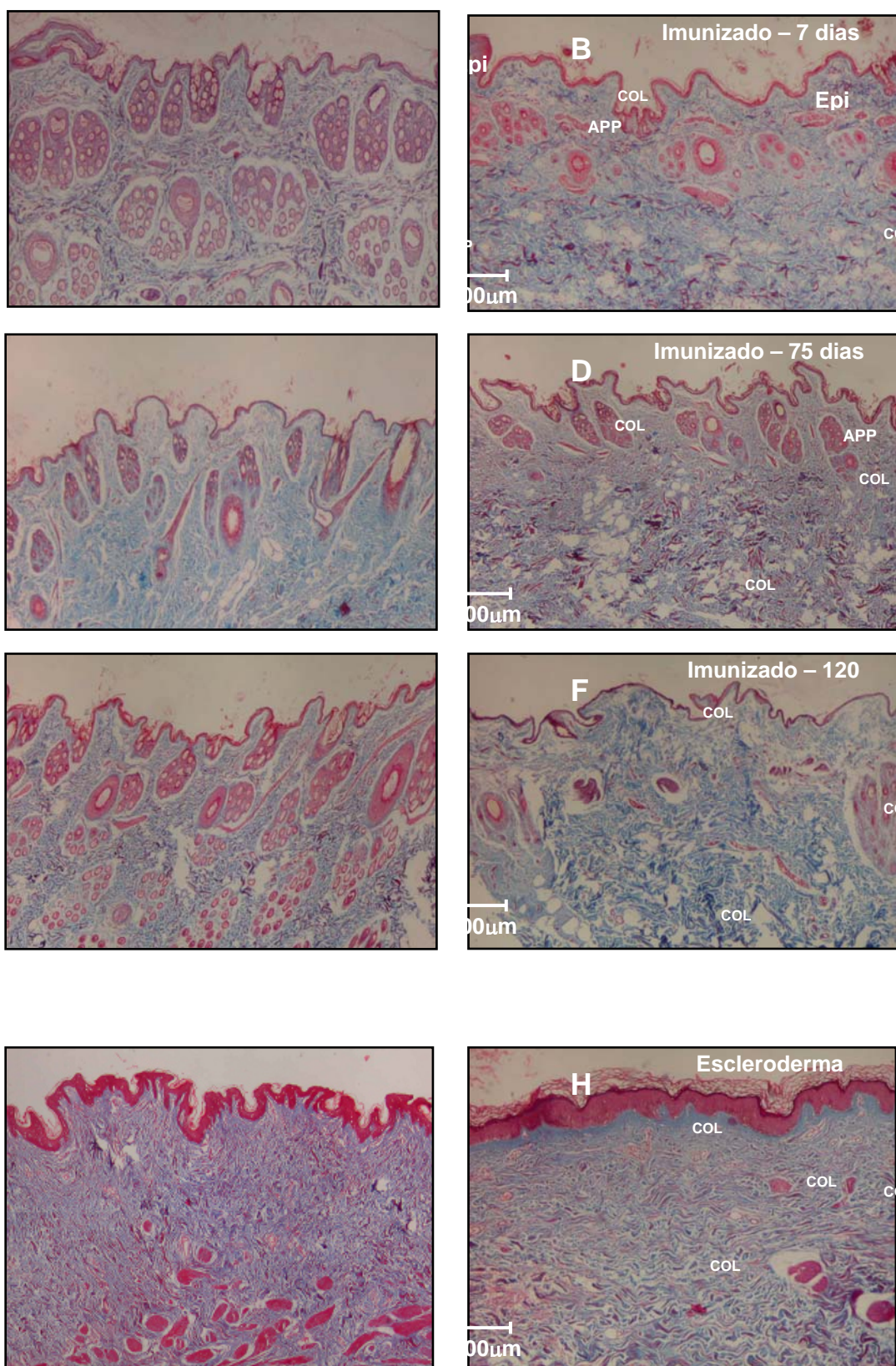
## **4 - RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise histológica

Sob coloração pelo tricrômico de Masson, a análise morfológica das amostras de pele dos animais imunizados com 7, 75 e 120 dias mostrou epiderme (Epi) íntegra (Figura 1B, 1D, 1F) mas com depósito progressivo de colágeno (COL) na derme superficial e profunda, bem como ao redor dos vasos e anexos (APP), modificando a conformação destes últimos. Em contraste, as amostras de pele dos animais controles (Figura 1A, 1C, 1E) se caracterizaram pela manutenção do tecido conjuntivo (CT), com preservação da arquitetura da matriz extracelular e a presença de anexos cutâneos. A pele de todos os pacientes com esclerodermia, independente da classificação clínica, apresentou comprometimento importante, caracterizado pelo aumento de colágeno em toda a derme e tecido subcutâneo, assim como grandes feixes de colágeno ao redor de vasos sanguíneos que se mostraram reduzidos em número e com espessamento da camada adventícia (Figura 1H). Os pacientes controles não apresentaram estas alterações (Figura 1G), mantendo a organização da matriz extracelular.

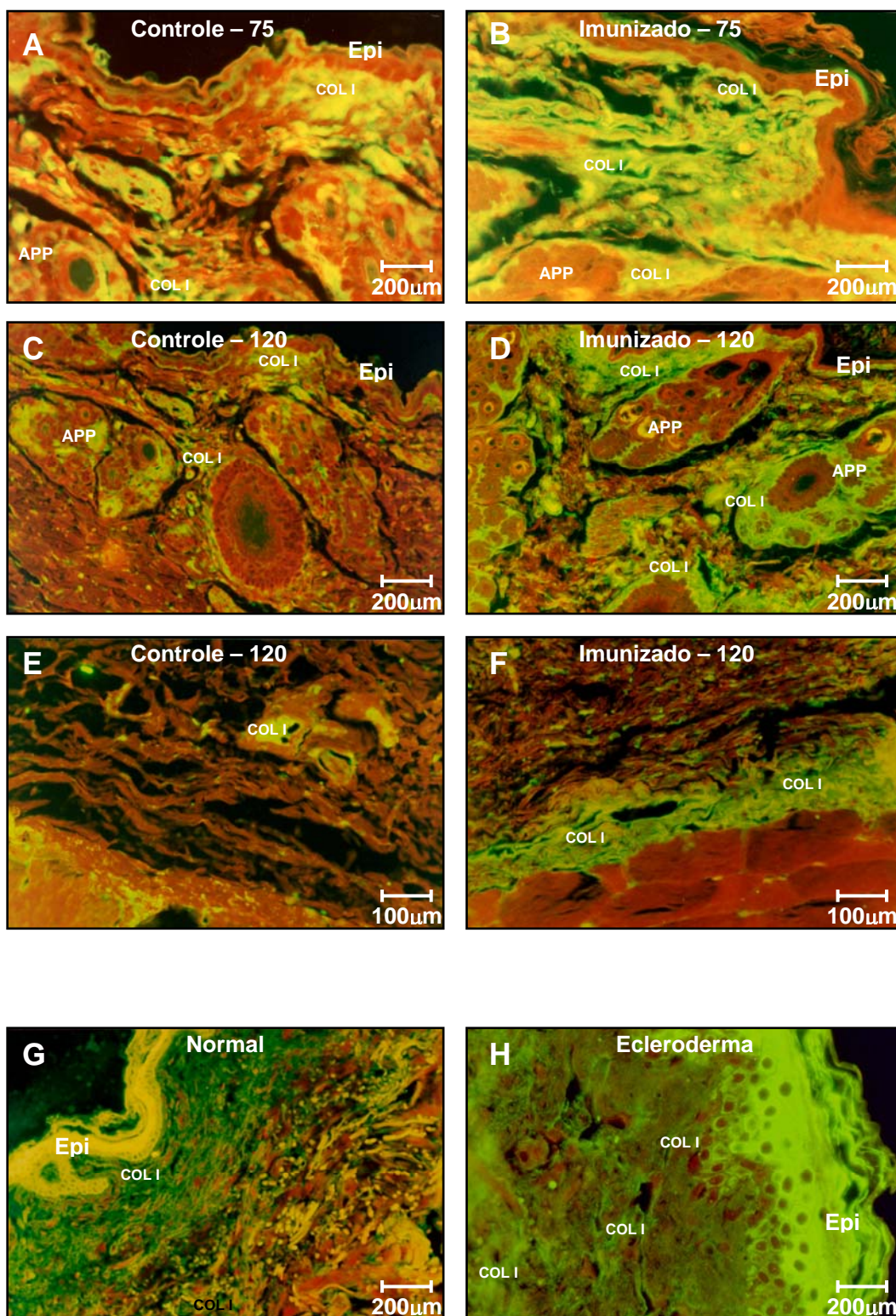


**Figura 1 - A-F:** Pele de coelhos controles e imunizados corada com tricrômico de Masson. **A**-coelho controle 7 dias, **B**-coelho imunizado 7 dias, **C**-coelho controle 75 dias, **D**-coelho imunizado 75 dias, **E**-coelho controle 120 dias, **F**-coelho imunizado 120 dias. **G-H:** Pele humana normal e de esclerodermia corada com tricrômico de Masson. **G**-normal, **H**-esclerodermia. (Aumento: 400X); Epi-epiderme; APP-anexos; Col-Colágeno; CT-tecido conjuntivo.



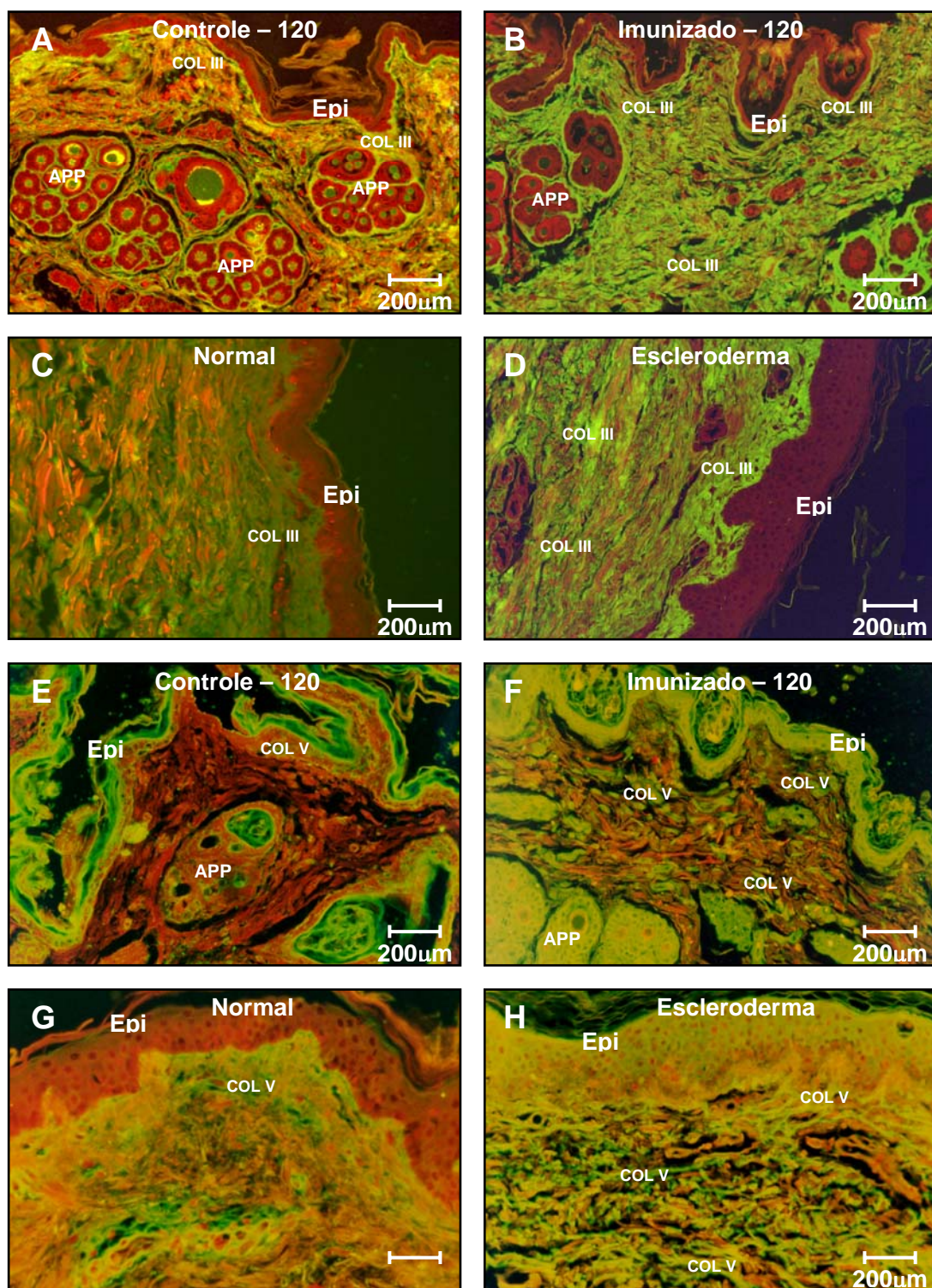
## 4.2. Análise imunohistoquímica

A imunomarcagem com anticógeno I localizou-se na epiderme e derme dos coelhos (Figure 2A, 2C, 2E) e pacientes (Figure 2G) controles. Entretanto, Após 75 e 120 dias da imunização dos coelhos (Figure 2B, 2D, 2F), o colágeno tipo I (COL I) foi expresso mais intensamente na derme profunda e ao redor dos anexos. Esta distribuição do colágeno tipo I foi muito semelhante a dos pacientes com esclerodermia (Figure 2H). O colágeno tipo III (COL III), com seu padrão de fibras finas, localizou-se principalmente em região papilar dérmica na pele dos coelhos (Figura 3A) e pacientes (Figura 3C) controles. Em contraste, a pele dos coelhos imunizados de 120 dias mostrou forte expressão do colágeno tipo III (COL III) envolvendo toda a derme superficial e profunda (Figura 3B). Nos pacientes com esclerodermia, observou-se a mesma distribuição do colágeno tipo III, ao longo da derme (Figura 3D). O colágeno tipo V, detectado quantitativamente em menor percentagem, apresentou padrão de fibras finas, imunomarcado tenuamente em região de membrana basal nos coelhos (Figura 3E) e pacientes controles (Figura 3G). Já nos animais imunizados, observou-se o colágeno tipo V (COL V) sob a forma de feixes mais espessos e distorcidos, localizado ao longo da derme papilar e profunda (Figura 3F). Novamente, o mesmo padrão foi observado na pele dos pacientes com esclerodermia. Nesta situação, o colágeno tipo V (COL V) foi identificado na junção dermo-epidérmica, sob forma de rede de fibras espessas que se projetam por entre os queratinócitos e derme papilar (Figura 3H), podendo corresponder à formação da placa esclerodérmica.



**Figura 2 – A-F**, IMF da pele de coelhos controles e imunizados após 75 e 120 dias da imunização, marcada com anticógeno tipo I. **A**-coelho controle 75 dias, **B**-coelho imunizado 75 dias, **C**-coelho controle 120 dias, **D**-coelho imunizado 120 dias, **E**-coelho controle 120 dias, **F**-coelho imunizado 120 dias. **Painéis G-H**: Pele humana normal e esclerodérmica marcada com anticógeno I por IMF. **G**-pele normal, **H**-esclerodermia. (Aumento: 100X painéis A-D, G-H; 200X em painéis E-F) Epi-epiderme; APP-anexos; Col I-colágeno tipo I.





**Figura 3 - Paineis A-H:** IMF da pele de coelhos controles e imunizados e pele humana normal e esclerodérmica marcada com anti-colágeno tipo III (A-D) e V (E-H). **A e E**-coelho controle 120 dias, **B e F**-coelho imunizado 120 dias, **C**-pele normal, **D**-pele esclerodérmica. **G**-pele normal, **H**-esclerodermia (Aumento: 100X em A-H) Epi- epiderme; APP- anexos; Col III-colágeno tipo III; Col V- colágeno tipo V.

### 4.3. Análise morfométrica

A análise morfométrica das lâminas de pele dos animais mostrou maior depósito de colágeno total no grupo imunizado, comparado ao controle, com diferença estatística significativa, nos animais sacrificados após 75 dias (Tabela 1) e 120 dias (Tabela 2) da imunização.

**Tabela - 1** – Comparação do depósito total de colágeno nos animais controles e imunizados após 75 dias da imunização

Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	p
Controle	7	5097,14	761,01	287,63	0,003
Imunizado	7	6523,86	685,58	259,12	

NOTA:  $p < 0,05$  estatisticamente significativa – Test T- Student

**Tabela - 2** – Comparação do depósito total de colágeno nos animais controles e imunizados após 120 dias da imunização

Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	p
Controle	7	4979,12	443,29	167,55	0,005
Imunizado	7	6680,79	1096,87	414,58	

NOTA:  $p < 0,05$  estatisticamente significativa – Test T- Student

#### 4.4. Escore da imunofluorescência

A imunomarcção com anticólagenos tipo I, III e V foi quantificada através do escore da fluorescência, que mostrou maior expressão destes colágenos, revelando maior comprometimento da pele, no grupo imunizado de 75 dias, com diferença estatística significativa, comparado ao grupo controle que teve menor expressão e menor comprometimento cutâneo. Já no grupo imunizado de 120 dias, houve maior expressão somente para o colágeno tipo V, com relação ao grupo controle.

**Tabela - 3** – Escore da imunofluorescência dos colágenos tipo I, III e V do grupo imune e controle após 75 dias da imunização

Colágenos	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	p
Anti - I	controle	5	1,60	0,89	0,40	0,013
	imune	5	3,40	0,89	0,40	
Anti - III	controle	5	2,60	0,54	0,24	0,024
	imune	5	4,40	1,34	0,60	
Anti - V	controle	5	1,80	0,44	0,20	0,012
	imune	5	3,00	0,70	0,31	

NOTA:  $p < 0,05$  estatisticamente significantes -Test T- Student

**Tabela - 4** – Escore da imunofluorescência dos colágenos tipo I, III e V do grupo imune e controle após 120 dias da imunização

Colágenos	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	p
Anti - I	controle	6	2,33	0,81	0,33	0,113
	imune	7	3,00	0,57	0,21	
Anti - III	controle	6	2,66	0,81	0,33	0,067
	imune	7	3,57	0,78	0,29	
Anti - V	controle	6	1,66	0,51	0,21	0,001
	imune	7	3,14	0,69	0,26	

NOTA:  $p < 0,05$  estatisticamente significantes - Test T- Student

## **5 - DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

Apresentamos um modelo original de esclerodermia induzido pelo colágeno V humano, em animais normais, que desenvolvem alterações morfológicas idênticas às observadas em pacientes com esclerodermia. Nossa descoberta introduz na Literatura Médica um novo modelo experimental, que poderá ser útil para o entendimento da patogênese e tratamento da esclerodermia. Trabalho com modelo de camundongo TSK demonstrou igualmente, através de técnicas moleculares, que o colágeno tipo V apresenta particularidades importantes, exercendo papel relevante neste outro modelo de esclerodermia<sup>9</sup>.

O modelo de esclerodermia foi descoberto no nosso laboratório, quando ao se imunizar coelhos com colágeno V humano para obtenção de anti-soro, os animais desenvolveram alterações macroscópicas em pulmões, com visualização de pontos hemorrágicos na superfície do órgão. À princípio, suspeitou-se de processo infeccioso pulmonar, porém o exame histopatológico revelou presença de importante vasculite e início de fibrose intersticial. A reprodutividade do fenômeno em outros coelhos sugeriu a descoberta de modelo experimental de vasculite, motivando a realização de tese de doutorado pela pesquisadora Walcy Rosolia Teodoro<sup>23</sup>.

Contudo, a presença de importante espessamento da íntima vascular por fibrose, causando inclusive obliteração do lúmen vascular, associado a depósito de colágeno no interstício pulmonar, especialmente nas bases



pulmonares, lembraram aspectos histológicos observados na esclerose sistêmica. Assim, ao realizarmos a histologia de outros órgãos, habitualmente envolvidos na esclerodermia, como pele, esôfago, coração, sinóvia e rim, confirmamos com grande satisfação que a hipótese havia se concretizado<sup>12-14</sup>.

Motivados pela possível descoberta de um novo modelo experimental de esclerodermia, passamos a realizar inúmeros experimentos no Laboratório que resultaram em descobertas muito interessantes. Verificamos, por exemplo, que cultura de células miofibloblasticas *in vitro*, pela técnica do *splant*, obtida da artéria pulmonar de coelhos fêmeas imunizadas com colágeno V, exibiu comportamento anômalo, pois se multiplicavam rapidamente, além de sintetizarem colágenos dos tipos I, III e V em grande quantidade. O mesmo resultado foi observado quando fibroblastos obtidos da pele foram cultivados *in vitro* (dados não publicados).

Os próximos passos tiveram como objetivo reforçar a idéia de que estávamos de fato frente a um novo modelo experimental de esclerodermia. Neste sentido, observamos a presença de apoptose de células endoteliais pelo teste do TUNEL (dados ainda não publicados) e comprovamos a existência de manifestações de autoimunidade nos animais imunizados<sup>24</sup>. Consideramos importante estudar em detalhes o processo de remodelamento e de fibrilogênese neste modelo experimental induzido pelo colágeno tipo V, e se possível, comparar os resultados com os de pacientes com esclerodermia que foram os objetivos desta Tese.

Resultados obtidos no presente estudo são de grande relevância, e certamente contribuirão no melhor entendimento dos mecanismos patogênicos que causaram as alterações histológicas semelhantes as da esclerodermia observadas no modelo experimental. Entre os achados destacam-se: a precocidade do início do remodelamento que esteve presente após a primeira semana da imunização; a intensa e progressiva ativação do fibroblasto, que sintetiza os colágenos dos tipos I, III e V, em especial do Colágeno V; finalmente a expressão do colágeno V estruturalmente defeituoso. Embora preliminar, e a casuística seja pequena, houve grande coincidência de achados entre o modelo experimental e a esclerodermia humana.

Demonstramos que animais imunizados sintetizam precocemente colágenos neste modelo experimental, uma vez que após 7 dias da primeira imunização com o colágeno tipo V, identificou-se intenso depósito de colágeno na matriz extracelular, demonstrado pela coloração com tricrômico de Masson e confirmado por imunohistoquímica. Este achado é muito importante, pois sugere haver ativação precoce de células endoteliais, que por sua vez, estimulariam fibroblastos a produzirem proteínas matriciais. Este dado sugere a possível existência de receptores para fragmentos de colágeno V na superfície endotelial, que quando ativadas liberariam mediadores pró-fibróticos, como endotelina e TGF beta. Este resultado confirma estudos da literatura que sugerem a apoptose ou ativação endotelial como causa desencadeadora da esclerodermia em humanos<sup>25</sup>.

Contudo, não achamos que este seja o único mecanismo envolvido na patogênese do dano vascular observado no modelo experimental ou mesmo na esclerodermia humana. Possivelmente, existe também a participação de antígenos ocultos *self* como, por exemplo, fragmentos do colágeno tipo V liberados durante o dano vascular, que uma vez expostos induziriam a formação de anticorpos contra estas proteínas, originando uma persistente doença autoimune. Evidências que favorecem esta idéia é a presença de autoanticorpos contra colágenos tipo IV e V nos soros de pacientes com esclerodermia <sup>26,27</sup> e também nos soros de coelhos do nosso modelo experimental <sup>24</sup>. Além do mais, no soro destes coelhos detecta-se também imunocomplexos circulantes que não desaparecem, mesmo após termino das imunizações com o colágeno V <sup>24</sup>.

Desde que postulamos haver a exposição de fragmentos do colágeno V, que contribuiriam na perpetuação do dano vascular e da fibrose no modelo de esclerodermia, realizamos indução de tolerância nasal com micro dose diária de colágeno V, nos animais com doença estabelecida (150 dias do início da imunização). Para a nossa surpresa, houve a regressão das alterações vasculares e de fibrose, quando se examinou estes animais após 60 dias de tolerância. Estes resultados sugerem fortemente que, no nosso modelo experimental existe a participação da imunidade celular, do tipo Th2, ativada por antígenos específicos, por exemplo, fragmentos do colágeno tipo V *self* <sup>28</sup>.

Outro resultado importante do estudo refere-se ao encontro da expressão aumentada do colágeno tipo V, tanto em peles de coelhos

imunizados como de pacientes com esclerodermia. Além disso, enquanto a pele normal exibe fibrilas muito finas de colágeno tipo V em pequena quantidade, nos animais imunizados e pacientes com esclerodermia, demonstrou-se quantidade aumentada desta proteína, com característica estrutural anômala, formando fibras espessas e densas que invadem a derme, ao redor de vasos e anexos. Embora o número de doentes seja pequeno, estes dados preliminares indicam que o remodelamento e a fibrilogênese são semelhantes tanto em animais do modelo experimental como nos pacientes com esclerodermia.

Estudos anteriores desenvolvidos no nosso laboratório mostraram que fibroblastos isolados da derme de coelhos imunizados e de pacientes com esclerodermia, quando submetidos à cultura *in vitro* pela técnica do *explant*, encontravam-se ativados, com grande capacidade de multiplicação e de sintetizar grande quantidade colágenos dos tipos I, III e V. A análise imunohistoquímica destes colágenos expressos *in vitro*, revelou que o colágeno tipo V, além de ser abundante, formava feixes espessos e distorcidos, entremeados às fibras de aspecto normal dos tipos I e III.

Concluimos que neste modelo experimental, tanto os fibroblastos teciduais como os cultivados *in vitro* encontram-se ativados, sintetizando elevadas quantidades de colágenos dos tipos I, III e V. Estranhamente, o tipo V que é normalmente encontrado em menor proporção, está expresso de forma defeituosa em ambas as situações. Esta descoberta é bastante relevante, pois esta proteína é a principal responsável no processo da fibrilogênese. O colágeno V se copolimeriza com os tipos I e III para formar

fibrilas heterotípicas, no qual a porção tripla hélice helicoidal está oculta no interior da fibrila e o domínio globular amino terminal se projeta para a superfície. Este domínio regula o crescimento fibrilar, impedindo fisicamente que novos monômeros se acrescentem à fibrila. Devido a estas características, o colágeno V tem função importante na organização, crescimento e regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas<sup>29-31</sup>. Estas fibrilas heterotípicas estão distribuídas na derme, tendões, ligamentos, ossos, vasos, sinóvia<sup>32</sup>. Ademias, esta molécula é bastante preservada e imunogênica, pelo fato de manter os telopeptídeos terminais NH<sub>2</sub> e COOH<sup>33</sup>.

Assim, entende-se porque a expressão de colágeno tipo V anômalo e em quantidade aumentada, tanto nos animais do modelo experimental, como nos humanos, é um achado significativo. Primeiramente, este aglomerado de fibras heterotípicas, estruturalmente aberrante, formado por fibrilas densas e distorcidas, secretadas pelos fibroblastos, representa a placa esclerodérmica. Em segundo lugar, a origem desta placa defeituosa, seria conseqüência da presença do colágeno tipo V anômalo, pois esta molécula regula o processo da fibrilogênese. E finalmente, concluímos que houve modificação do fenótipo do fibroblasto, que passou a sintetizar muito colágeno, incluindo o tipo V com característica estrutural diferente.

Embora preliminar, estas alterações foram observadas igualmente nos pacientes com esclerodermia. Se confirmadas com casuística maior, abre-se uma grande perspectiva de abordagem terapêutica, pois estamos postulando que a histoarquitetura anômala do tecido matricial visto na

esclerodermia, possa ser atribuído à síntese de colágeno tipo V atípico, produzido por fibroblastos ativados. Nesta condição, o tratamento objetivaria encontrar o sitio do erro metabólico, possivelmente localizado no interior do fibroblasto aberrante ou tentar bloquear os estímulos dirigidos a estes fibroblastos.

Comentamos anteriormente que a indução de tolerância nasal com colágeno V foi capaz de inibir estas anormalidades. De que forma? Postulamos a existência de duas vias patogênicas no desencadeamento da esclerodermia: a via direta pela ação do colágeno V inoculado sobre o endotélio (remodelamento precoce) e a via secundária pelo desenvolvimento de autoimunidade originada pela exposição de antígenos *self*, possivelmente, fragmentos de col V (remodelamento tardio e persistente). Sugerimos que o mecanismo de ação da indução da tolerância nasal foi a de gerar células T reguladoras, que sintetizam citocinas imunossupressivas, como IL-10 e IL-4, capazes de desativar a via de ativação imunológica T dependente (Th2), inibindo a síntese de citocinas pró-fibróticas e diminuindo a síntese de autoanticorpos, como anti colágeno V <sup>34</sup>.

A análise do conjunto dos nossos resultados, permite sugerir que agentes endógenos ou exógenos como bactérias, vírus, drogas, produtos de degradação tecidual, imunoglobulinas, imunocomplexos e elementos diversos, que se ligam à superfície endotelial, possam causar ativação destas células e conduzir à lesão da membrana basal, com exposição de antígenos *self*, originando uma doença auto-imune como a esclerodermia.

Dentre os inúmeros modelos experimentais de esclerodermia, o nosso parece ser o mais interessante para a compreensão da apresentação humana, pois é desenvolvido em animal sadio e sem manipulação genética. O avanço das pesquisas neste modelo tem revelado a existência de grande similaridade de achados morfológicos e imunológicos entre os animais do modelo experimental e os apresentados pelos doentes com esclerodermia, tornado este modelo instrumento de grande importância para a compreensão da patogênese da enfermidade e no ensaio de drogas terapêuticas.

Concluimos que coelhos sadios, imunizados com colágeno tipo V, desenvolvem alterações morfológicas teciduais semelhantes às encontradas na esclerodermia humana. O remodelamento da pele à custa de depósito de colágenos dos tipos I, III e V é precoce e intensifica-se progressivamente ao longo das imunizações. Adicionalmente, além da expressão do colágeno V ser maior, esta molécula esteve presente com a estrutura morfológica bizarra, propiciando a formação de fibrilas heterotípicas com padrão morfológico diferente do habitual, devido a este colágeno regular a fibrilogênese. Esta fibrilogênese defeituosa origina a placa esclerodérmica, em consequência de remodelamento atípico da matriz extracelular da pele, pela presença de fibrilas de colágeno defeituosas, produzidas por fibroblastos com fenótipo modificado.

Concluimos também que, a fibrose presente na esclerodermia é diferente da fibrose da cicatrização fisiológica, pois na doença autoimune a histoarquitetura tecidual está modificada pela presença de fibrilas de

colágenos modificadas, enquanto na cicatrização normal, as fibrilas heterotípicas estão preservadas. Esta nova conceituação, abre perspectivas na busca de novos procedimentos terapêuticos para o tratamento desta grave enfermidade.



## **6 - CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

Concluimos que o remodelamento da pele, no modelo experimental de esclerodermia, induzido em coelhos pela imunização com colágeno tipo V, ocorre às custas de importante depósito de colágenos dos tipos I, III e V. A histoarquitetura matricial defeituosa (placa esclerodérmica) é provavelmente conseqüência da expressão estrutural anômala do colágeno tipo V, pois esta molécula é a responsável pela fibrilogênese. Embora preliminar, o modelo experimental exhibe alterações morfológicas muito semelhantes às observadas na esclerodermia humana, portanto instrumento muito útil no estudo da patogênese e ensaio terapêutico aplicados a esta enfermidade.

## **7 - REFERÊNCIAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Krieg T, Meurer M. Systemic scleroderma, clinical and pathophysiological aspects. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18:457-484.
2. Fleischmajer R, Gay S, Meigel WN, Perlish JS. Collagen in the cellular and fibrotic stages of scleroderma. *Arthritis Rheum* 1978; 21:418-428.
3. Fleischmajer R, Dessau W, Timpl R, Krieg T, Luderschmidt C, Wiestner M. Immunofluorescence analysis of collagen, fibronectin, and basement membrane protein in scleroderma skin. *J Invest Dermatol* 1980; 72:270-275.
4. Fleischmajer R, Gay S, Perlish JS, Cesarini JP. Immunoelectron microscopy of type III collagen in normal and scleroderma skin. *J Invest Dermatol* 1980; 75:189-191.
5. Morrow J, Nelson L, Watts R, Isenberg D. *Autoimmune Rheumatic Disease* 1999. Oxford University Press, Oxford, pp 277.
6. Stastny P, Stembridge VA, Ziff M. Homologous disease in the adult rat, a model for autoimmune disease. I. General features and cutaneous lesions. *J Exp Med* 1963; 118:635-648.
7. Muryoi T, Kasturi KN, Kafina MJ, Saitoh Y, Usuba O, Perlish JS, Fleischmajer R, Bona CA. Self reactive repertoire of tight skin mouse: immunochemical and molecular characterization of anti-topoisomerase T autoantibodies. *Autoimmunity* 1991; 9:109-117.
8. Osborn TG, Bauerr NE, Ross SC. The tight skin mouse physical and biochemical properties of the skin. *J Rheumatol* 1983; 10: 793-796.
9. Saito S, Kasturi K, Bona C. Genetic and immunologic features associated with scleroderma-like syndrome of TSK mice. *Curr Rheumatol Rep* 1999; 1:334-337.
10. Gershwin ME, Abplanalp H, Castles JJ, Ikeda RM, van der Water J, Eklund J, Haynes D. Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Exp Med* 1981; 153:1640-1659.
11. Ruzec MC, Jha S, Ledbetter S, Richards SM, Garman RD. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of human disease. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1319-1331.

12. Teodoro WR, Miron BG, Ogido LTI, Velosa APP, Abatepaulo F, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Synovial remodeling process induced by type V collagen immunization in rabbits. *Pathol Res Pract* 2003; 199:605-612.
13. Teodoro WR, Velosa APP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, Sonohara S, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue disease. *Pathol Res Pract* 2004; 200:681-691.
14. Yoshinari NH, Teodoro WR, Ogido LTI, Velosa APP, Prizon CP, Miron B, Bissoli JCC, Cuentas ERP, Capelozzi AL. Modelo experimental de doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) induzido por colágeno do tipo V. *Rev Bras Reumatol* 2002; 42:295-305.
15. Chanut-Delalande H, Fichard A, Bernocco S, Garrone R, Hulmes DJ, Ruggiero F. Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry. *J Biol Chem* 2001; 276:24352-24359.
16. Chanut-Delalande H, Bonod-Bidaud C, Cogne S, Malboyres M, Ramirez F, Fichard A, Ruggiero F. Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. *Mol Cell Biol* 2004; 24:6049-6057.
17. Hay ED. Matrix assembly. In: Hay ED (eds). *Cell biology of extracellular matrix*, (20th ed) Plenum 1991, New York, pp 221-249.
18. Hake MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zheng Y, Woods K, Smith GN, Cummings OW, Heidler KM, Blum JS, Wilks DS. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of Type V Collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol* 2002; 169:1542-1549.
19. Wilks DS. Autoimmune responses to grafted lungs: immune responses to a native collagen-type V collagen. *Graft* 2003; 6:42-49.
20. Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, Smith GN Jr, Cummings OW, Foresman BH, Fujisawa T, Wilks DS. Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:26-34.
21. Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, Smith GN Jr, Cummings OW, Fujisawa T, Wilks DS. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allograft by type V collagen-induced oral tolerance. *Transplantation* 2002; 73:500-505.

22. Niyibizi C, Fietzek PP, van der Rest M. Humantype V collagens. Evidence for the existence of an  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 2(V)$ ,  $\alpha 3(V)$ . *Col Mol* 1984; 259:14170-14174.
23. Teodoro WR. Imunogenicidade ao colágeno tipo V em coelhos: um novo modelo experimental para o estudo da vasculite de hipersensibilidade autoimune. 113 pag. Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001
24. Callado MRM. Caracterização da resposta imune em modelo experimental de esclerodermia induzida pelo colágeno tipo V.. 119 pag. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005
25. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 2550-2562
26. Mackel AM, DeLustro F, Harper FE, LeRoy EC. Antibodies to collagen in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1982, 25:522-531.
27. Rient L, Marchini B, Dolcher MP, Puceti A, Bombardieri S, Migliorini P. Anticollagen antibodies in systemic sclerosis and in primary Raynaud's phenomenon. *Clin Exp Immunol* 1994; 93:1709-1715.
28. Velosa APP. Indução de tolerância nasal com colágeno tipo V em modelo experimental de esclerodermia. Dissertação de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
29. 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* 2004; 279:53331-53337.
30. 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* 2004; 24:6049-6057.
31. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/IV collagen interactions in the regulation of fibril assembly 2001; 32:223-237.
32. Fessler JH, Fessler LI. Type V collagen. In: Structure and function of collagen types. Mayne R and Burgeson RE Eds. Academic Press, Orlando, 1987, 81-103.

- 33 Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagen: controlling elements in corneal morphogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1990; 580:143-160.
34. Taylor, A.; Verhagen, J.; Blaser, K.; Akdis, M.; Akdis, C. A. (2006) Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ : the role of T regulatory cells. *Immunology*. 117: 433-442.

## **8 - APÊNDICES**

---



