

**MARIA ROSELI MONTEIRO CALLADO**

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

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

**Área de concentração: Reumatologia**

**Orientador: Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari**

**São Paulo  
2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Callado, Maria Roseli Monteiro

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

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

Área de concentração: Reumatologia.

Orientador: Natalino Hajime Yoshinari.

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

USP/FM/SBD-139/05

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Agradecer...**

Agradecer ao SER

Por nos conceder

Mente

Para reconhecer

Gente...

Felicidade é: conviver e aprender

Pacientemente

Com tantos entes

Diferentes

Que nos ajudam a crescer

Sem esquecer

De ser sempre uma

Semente

Que irá nascer

Em outro ser

E florescer eternamente

Passando o saber....

Fortaleza, 28 de Maio de 2005

## A mulher na Reumatologia da USP

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

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

# SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

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

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



## RESUMO

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

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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

