

Auto-imunidade e Colágeno V^(*)

Autoimmunity and Collagen V^()*

Cristiane Carla de Oliveira⁽¹⁾, Walcy Rosolia Teodoro⁽²⁾, Ana Paula Pereira Velosa⁽³⁾,
Natalino Hajime Yoshinari⁽⁴⁾

RESUMO

As proteínas da matriz extracelular (MEC) e seus componentes estão sendo amplamente estudados na literatura médica, assim como sua relação com o remodelamento tecidual presente nas doenças reumáticas. Neste artigo, mostramos a importância do estudo do colágeno do tipo V no entendimento da etiologia da esclerodermia, no que se refere ao desencadeamento da auto-imunidade nesta enfermidade. Estudos em nosso laboratório demonstram que a sensibilização com colágeno do tipo V em coelhos pode resultar em um modelo animal de esclerodermia. Diante destes fatos, sugerimos que pesquisas neste campo podem ser de grande valia no desenvolvimento de novas condutas terapêuticas.

Palavras-chave: colágeno tipo V, auto-imunidade, esclerodermia.

ABSTRACT

The extracellular matrix (ECM) proteins and their components have been widely studied in medical literature, as well its relationship with the tecidual remodeling present in the rheumatic disease. In this paper we show the importance of understanding the role of type V collagen as an important trigger of rheumatic autoimmune diseases. Studies in our laboratory demonstrate that type V collagen sensibilization in rabbits, could result in an animal scleroderma model. In this way we suggested that researches in this field can be worthy in development of new therapeutic procedures.

Keywords: Type V collagen, autoimmunity, scleroderma.

INTRODUÇÃO

Pesquisas referentes à matriz extracelular (MEC) e seus componentes estão se acumulando rapidamente na literatura médica. Conhecimentos advindos destes estudos são particularmente importantes na reumatologia no entendimento do remodelamento tecidual que acarretam disfunções das estruturas comprometidas, como na osteoartrite ou alterações morfológicas e estruturais observadas nos órgãos acometidos na esclerodermia.

O comprometimento matricial nem sempre é secundário a distúrbios imunológicos ou sanguíneos. Pode ser primário como nas doenças hereditárias, por exemplo a síndrome de Ehlers-Danlos, ou sua regulação, diferenciação e remodelamento estarem subordinados às citocinas secretadas principalmente por células endoteliais, epiteliais

e fibroblastos⁽¹⁾.

Ao final do século passado, surgiram duas linhas de pesquisas independentes relacionadas ao colágeno tipo V que revelam em comum a existência de antigenicidade a esta molécula, originando em certas condições o desencadeamento de auto-imunidade. Trabalhos do grupo liderado por Robert Wilkes demonstraram que a rejeição do transplante pulmonar alogênico em animais estava ligado ao desenvolvimento de auto-imunidade celular aos componentes tissulares que possuíam colágeno tipo V e que a indução da tolerância imunológica a este colágeno inibiria a rejeição do órgão⁽²⁾.

No Brasil, o laboratório de MEC da disciplina de Reumatologia da Universidade de São Paulo (USP) desenvolveu modelo de auto-imunidade em coelhos que reproduz

Trabalho realizado na Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Recebido em 23/05/05. Aprovado, após revisão, em 02/11/05. *Suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Centro de Estudos em Reumatologia da cidade de São Paulo, Fundação do Desenvolvimento Administrativo (FUNDAP).

1. Bióloga bolsista da FAPESP e da Faculdade de Medicina da USP.

2. Doutora em Ciências da Faculdade de Medicina da USP.

3. Mestre em Ciências da Faculdade de Medicina da USP.

4. Professor Associado da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da USP.

Endereço para correspondência: Natalino Hajime Yoshinari, Av. Dr. Arnaldo 455, 3º andar, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil, tel (11) 3066-7211, fax (11) 3066-7490, e-mail: matrix@lim17.usp.br

manifestações sistêmicas compatíveis às observadas na esclerodermia, incluindo presença de auto-anticorpos dirigidos aos constituintes celulares (FAN) após imunização dos animais com colágeno tipo V. Neste modelo animal predomina a resposta humoral, e os primeiros resultados com tolerância nasal ao colágeno tipo V indicam melhora da disfunção dos diferentes órgãos⁽³⁾.

Certamente, estes novos conhecimentos adquiridos no campo da Patologia e da Reumatologia poderão revolucionar conceitos de etiopatogênese relacionados a diferentes enfermidades, razão pela qual consideramos oportuno um breve resumo sobre auto-imunidade e colágeno V.

AUTO-IMUNIDADE E COLÁGENO V

É estabelecido que as células estejam imersas em uma malha protéica denominada MEC, que modula o espaço intra e intercelular. Esta malha protéica tem sido por muitos anos reconhecida por apresentar composição, organização e propriedades físicas extremamente importantes na regulação de mecanismos celulares, tais como: diferenciação, proliferação, migração, adesão, além da manutenção da forma celular. É importante enfatizar que os componentes da matriz podem desempenhar papéis estruturais e funcionais diferentes, dependendo da sua composição química e arranjo molecular.

Um dos componentes fibrilares da MEC responsável pelo arranjo molecular dos tecidos é o colágeno. Durante a evolução, a estrutura helicoidal e a composição de aminoácidos desta proteína foram altamente conservadas, facilitando sua análise e identificação de um grande número de tipos de colágeno existentes nos vertebrados. O colágeno pode variar de acordo com a seqüência e a quantidade de resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias de sua molécula⁽¹⁾.

Entre os tipos de colágeno, o V é classificado como um membro da família dos colágenos fibrilares, com base em sua estrutura primária e seu potencial para formar fibrilas no interstício^(5, 6). A relação entre este tipo de colágeno e auto-imunidade já foi demonstrada em diversos experimentos, nos quais foram encontradas altas respostas a auto-anticorpos ligados à ativação de células T⁽⁷⁾. Foram também identificados anticorpos anticolágenos I, II, IV e V nos soros de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e vasculite, sendo que nesses casos provavelmente os colágenos IV e V estariam envolvidos com o processo de manutenção da lesão vascular⁽⁸⁾.

Estudos realizados em modelo de transplante de

pulmão desenvolvido em murinos mostraram que o colágeno tipo V é alvo da resposta imune para aloantígenos. Estes verificaram que o tecido conjuntivo peribronquiolar, interstício alveolar e membrana basal dos capilares, nos quais o colágeno tipo V está localizado, são os sítios de lesão patológica em resposta aos aloantígenos no modelo estudado⁽⁹⁾. Por outro lado, estudos da tolerância oral ao colágeno tipo V, nos recipientes de enxerto de pulmão, administrados anteriormente ao transplante, diminuíam as respostas de rejeição. A análise imunológica, radiológica e histológica dos animais receptores de enxerto tratados oralmente com colágeno tipo V, em relação ao controle, demonstrou diminuição de células polimorfonucleares e linfócitos no fluido bronquioalveolar, menos infiltrados nos enxertos, preservação da anatomia do enxerto e redução da rejeição patológica. A administração oral de colágeno tipo V, nos receptores de enxerto induziu aumento na produção de TGF- β , resultando na diminuição das respostas de hipersensibilidade tardia para os aloantígenos do doador, o qual era neutralizada pelo TGF- β ⁽²⁾.

Nesta mesma linha, foram também identificadas células T específicas para o colágeno tipo V durante os episódios de rejeição do enxerto de pulmão, as quais podem contribuir para a patogênese das respostas de rejeição. Estes estudos sugeriram que, uma vez que o colágeno tipo V é uma molécula altamente conservada entre indivíduos e espécies, este seria um alvo na resposta de rejeição no pulmão. Foi demonstrado que, durante o processo de rejeição e inflamação, o tecido sofre ação de metaloproteinasas, como a MMP-2 e MMP-3, e estas enzimas são capazes de clivar e expor o colágeno do tipo V, tornando-o imunogênico, e deste modo os diferentes peptídeos desta macromolécula poderiam induzir aloreatividade, desempenhando papel importante na rejeição do enxerto e remodelamento pulmonar⁽¹⁰⁾.

O colágeno V apresenta características próprias, pois durante a sua síntese conserva os domínios globulares e telopeptídeos (NH₃ e COOH), regiões reconhecidamente imunogênicas da molécula, assim como diversas isoformas que podem mudar o tipo e a proporção dos constituintes de suas cadeias⁽¹¹⁾. Pode ocorrer na forma de heterotrímero composto pelas cadeias $\alpha_1(V)$, $\alpha_2(V)$ e $\alpha_3(V)$ ⁽¹²⁾. Porém, a maioria dos tecidos contém a forma $[\alpha_1(V)]_2, [\alpha_2(V)]_1$, sendo a forma homotrímera $[\alpha_1(V)]_3$ pouco freqüente e descrita em linhagens de células pulmonares de hamster chineses⁽¹³⁾ e em endométrio de camundongos gestantes⁽¹⁴⁾.

O colágeno do tipo V é proporcionalmente o menor componente em massa nos tecidos, mas desempenha papel fundamental nos processos de proliferação e reparação

tecidual. A sua presença na membrana basal de vasos e em alguns tecidos mesenquimatosos é de extrema importância na ligação entre o colágeno IV da membrana basal e o conjuntivo frouxo dos órgãos⁽¹⁵⁾, participando ativamente na interação dos componentes da MEC e estabelecendo associação com outros tipos de colágeno, como os tipos I e III na pele e no interstício pulmonar⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

O colágeno do tipo V se distribui principalmente na córnea^(11, 19, 20), fígado⁽¹⁶⁾, baço⁽¹⁷⁾, pulmão⁽²⁰⁾ e pele⁽²⁰⁾, sendo responsável pela regulação do diâmetro das fibras de colágeno, através da formação de fibras heterotípicas (formadas por mais de um tipo de colágeno), constituídas mais frequentemente pelos tipos I/V e III/V⁽²¹⁾. Experimentos de fibrilogênese *in vitro*, realizados em camundongos transgênicos, indicam que o colágeno do tipo V regula a formação de fibras heterotípicas, interferindo na fibrilogênese *in vivo* de fibras de colágeno do tipo I. Exemplo clássico deste processo é encontrado na síndrome de Ehlers-Danlos, doença caracterizada pela mutação gênica do colágeno do tipo V. Outro aspecto importante na síntese das fibras de colágeno do tipo V, mas que permanece obscuro, é a função de seu fragmento proteolítico NH₂- terminal da cadeia α_3 (V). Este domínio apresenta a maior seqüência de aminoácidos de todas as cadeias α de colágeno, mas sua distribuição é limitada nos tecidos podendo refletir maior nível de especialização desta molécula⁽²²⁾. Claramente, o colágeno do tipo V é fundamental não somente para regular o diâmetro das fibras, mas também na integridade do tecido conjuntivo, apresentando funções diferentes dependendo da sua distribuição e isoformas moleculares.

Os aspectos imunogênicos da molécula de colágeno são de maneira geral, invariáveis entre todas as suas isoformas fibrilares. Cada um dos domínios da molécula (helicoidais e telopeptídeos globulares) apresenta imunogenicidade espécie-específica, sendo capaz de desencadear uma resposta imune independente, justificando de certa maneira, o fato de moléculas de procolágeno (forma precursora) e de colágeno denaturado apresentarem uma resposta mais difusa por parte do sistema imune (possuem mais seqüências de aminoácidos expostas, além dos domínios encontrados na molécula tradicional).

Por estas razões, e ainda por estudos recentes em nosso laboratório, que demonstram que a imunização com colágeno do tipo V pode induzir remodelamento na pele e órgãos internos, assim como o aparecimento de auto-anticorpos em coelhos da Nova Zelândia sadios, sugerimos que epítomos desta proteína podem estar envolvidos na perpetuação do processo de lesão e fibrose e em auto-imunidade nas doenças

difusas do tecido conjuntivo (DDTC)⁽³⁾.

A antigenicidade ao colágeno V foi demonstrada por Teodoro em 2001⁽²³⁾, que descreveu um modelo experimental original de auto-imunidade em pulmões de coelhos, após a imunização dos animais com colágeno tipo V humano, hemulsificado com adjuvante de Freund. Os coelhos sacrificados após 75 e 120 dias do início da imunização apresentaram alterações morfológicas progressivas, especialmente em lobos basais pulmonares, caracterizadas morfológicamente pelo espessamento da íntima vascular, depósito de colágeno nas regiões subendotelial, perivascular, peribrônquica e interstício pulmonar, com infiltrado neutrofilico⁽²⁴⁾. Posteriormente, Prizon em 2003⁽²⁵⁾, isolando a artéria pulmonar dos animais imunizados, demonstrou que esses vasos apresentavam remodelamento na camada íntima e mudança fenotípica dos fibroblastos, observado pelo aumento da expressão da α -actina de músculo liso neste órgão. Além das alterações pulmonares, os animais apresentaram positividade para anticolágeno tipos I, III e V no soro.

Posteriormente, Yoshinari e cols⁽²⁶⁾, em 2002 demonstraram que as alterações histológicas não estavam restritas ao tecido pulmonar, mas acometiam outros órgãos, como: coração, esôfago, rim, sinóvia, cartilagem e pele. O comprometimento cardíaco localizava-se no interstício, entre as fibras musculares com depósito de colágeno e espessamento da parede dos vasos, principalmente nos animais sacrificados após 120 dias de imunização. O esôfago destes animais mostrou diminuição do lúmen, deposição do colágeno na camada submucosa e perivascular, após 75 dias, mas o processo foi mais intenso nos animais sensibilizados de 120 dias. O parênquima renal apresentou discreta proliferação mesangial, espessamento da membrana basal e depósito de colágeno ao redor dos vasos do interstício renal mais visível nos animais de 120 dias. Quanto às alterações de membrana sinovial, foi observada ausência de infiltrado inflamatório após 75 e 120 dias da primeira imunização, porém com estratificação do epitélio de revestimento e intenso remodelamento com depósito de colágeno no tecido conjuntivo subsinovial⁽²⁷⁾. Ogido, em 2005⁽²⁸⁾, mostrou que estas alterações sinoviais eram resultantes do depósito dos colágenos I, III e V, e que os colágenos dos tipos III e V participam do processo de fibrose dos vasos deste tecido. Na cartilagem articular, as alterações foram mais nítidas nos animais imunizados de 120 dias, demonstradas pela mudança da MEC e pelo aumento do número de células semelhante ao encontrado em processos degenerativos. O que chamou nossa atenção nestes animais foi também o comprometimento da pele. Oliveira, em 2005⁽²⁹⁾, mostrou

que a pele apresentava mudanças em seu perfil histológico tanto na derme superficial, como na derme profunda e diminuição de anexos com depósito de colágeno. Surpreendentemente, as alterações da pele tinham início após sete dias da primeira imunização e eram progressivas até 150 dias. Estudos *in vitro*, utilizando fibroblastos de pele dos animais imunizados com colágeno do tipo V, também indicavam mudanças na síntese desta proteína e alterações no rearranjo das fibras de colágeno do tipo V, com o tempo de imunização⁽²⁹⁾.

Além das alterações morfológicas descritas nos diferentes órgãos, Callado, em 2005⁽³⁰⁾, demonstrou maior frequência de auto-anticorpos nos coelhos imunizados com colágeno do tipo V, pelo surgimento de fator antinuclear (FAN), padrão citoplasmático e auto-anticorpos possivelmente contra o complexo de Golgi. Todas estas constatações podem nos levar à confirmação de um envolvimento sistêmico, lembrando as alterações encontradas na esclerodermia^(31, 32).

Foi sugerido inicialmente, que a inoculação de colágeno do tipo V em coelhos promoveria a formação de imunocomplexos, 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 auto-imunidade, perpetuada pela contínua reexposição de epítomos do colágeno V, e conseqüente estímulo para produção dos correspondentes auto-anticorpos.

Entretanto, esta teoria não explica o remodelamento precoce da pele observado aos sete dias do início da inoculação com colágeno tipo V. Síntese precoce de colágeno sugere ativação das células endoteliais, pelos epítomos do colágeno V com a liberação de peptídeos estimulatórios dos fibroblastos, como a endotelina e TGF β .

Esta descoberta dará um novo rumo para as pesquisas relacionadas à esclerodermia sistêmica em humanos, pois se trata de uma indução em animais sadios, reproduzindo o processo de doença encontrado na maior parte dos pacientes acometidos por esta enfermidade.

Pesquisas neste campo igualmente poderão auxiliar o esclarecimento da patogênese das demais doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) que cursam com lesão prolongada do complexo endotélio-membrana basal e exposição de antígenos ocultos presentes na matriz extracelular.

REFERÊNCIAS

1. 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. *Molecular and Cellular Biology* 23: 6049-57, 2004.
2. Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, Cummings OW, Foreman BH, Fujisawa T, Wilkes DS: Oral tolerance induction by type V collagen Downregulates lung allograft. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 26-34, 2001.
3. Yoshinari NH, Callado MR, Velosa APP, Viana VTS, Goldeinstein-Schainberg C, Carrasco S et al: Experimental Model of Scleroderma Induced in Rabbits. *Arthritis & Rheumatism* 52: s369, 2005.
4. Hay ED: Matrix assembly, In: Hay ED. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York, Plenum, p.221-249, 1991.
5. Adachi E, Hayashi T: "In vitro" formation of fine fibrils with a D-periodic banding pattern type V collagen. *Relat Res* 5: 225-32, 1985.
6. Kirivikko KI, Mlylyla R: Biosynthesis of the collagens. In: Piez; K.A. Reddi, A.H. *Extracellular Matrix Biochemistry*. ed. K.A. Piez; A.H. Reddi, Elsevier, New York, p. 83-118, 1984.
7. Kempt JD, Madri JA: The immune response to human type II and type V (AB2) collagen: antigenic determinants and genetic control in mice. *Eur J Immunol* 11: 90-4, 1981.
8. Moreland LW, Gay RE, Gay S: Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 60:412-8, 1991.
9. Mares DC, Heidler KM, Smith GN et al: Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 62-70, 2000.
10. Haque MA, Myzobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR et al: Evidence for immune responses to a self antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol* 169: 1542-49, 2002.
11. Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE: Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagen: controlling elements in corneal morphogenesis. *Ann NY Acad* 580: 143-60, 1990.
12. Vandenberg P, Kern A, Reis A, Luckenbill-Edds L, Mann K, Kühn K: Characterization of type V collagen maror cell binding site with affinity to the $\alpha 1$, $\beta 1$, and $\alpha 2$, $\beta 2$ integrins. *J Cell Biol* 113: 1475-83, 1991.
13. Haralson MA, Mitchel WM, Rhodes RK, Miller EJ: Evidence that the collagen in the culture medium of Chinese hamster lungs cells contains components related at the primary structural lie to alpha 1(V) collagen chain. *Arch Biochem Biophys* 229: 509-18, 1984.
14. Teodoro WR, Witzel SS, Velosa AP, Shimokomaki M, Abrahamsohn PA, Zorn TM: Increase of interstitial collagen in the mouse endometrium during decidualization. *Connect Tissue*

- Res 44: 96-103, 2003.
15. Aumailley M, Timpl R: Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. *J Cell Biol* 103: 1569-75, 1986.
 16. 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.
 17. Adachi E, Hayashi T: Comparison of axial banding patterns in fibrils of type V collagen and type I collagen. *Collagen Relat Res* 5: 27-38, 1987.
 18. Inkinen K, Turakainen H, Wolff H, Ahonen J: Cloning of c DNA for rat Pro $\alpha 1(V)$ collagen mRNA. Expression Patterns of type I, type III and type V collagen genes in experimental granulation tissue. *Connec Tissue Research* 40: 209-20, 1999.
 19. Birk DE, Fitch JM, Barbiarz JP, Linsenmayer YT: Collagen type I and collagen type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol*, 106: 999-1008, 1988.
 20. 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.
 21. Linsenmayer TF: Collagen In: Hay ED. ed *Cell. Biology of Extracellular Matrix*, 2. Ed. New York, Plenum Press p.7-43, 1991.
 22. Iamamura Y, Scott IC, Greenspan DS: The Pro- $\alpha 3(V)$ Collagen Chain. *J Biol Chem* Vol 275 (12): 8749-875, 2000.
 23. Teodoro WR: Imunogenicidade ao colágeno do tipo V em coelhos. Um novo modelo experimental para o estudo da patogênese da vasculite de hipersensibilidade autoimune. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 113 páginas, 2001.
 24. Teodoro WR, Velosa APP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, Sonohara S, Capelozzi VL, Yoshinari NH: Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract* 200: 681-91, 2004.
 25. 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 ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de especialista, 46 páginas, 2003.
 26. Yoshinari NH, Teodoro WR, Ogido LTI, Velosa APP, Prizon CP, Miron B, Bissoli JCC, 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.
 27. Teodoro WR, Miron BG, LT Ogido, 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.
 28. Ogido LTI: Análise morfológica e bioquímica da sinóvia de coelhos imunizados com colágeno do tipo V. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 94 páginas, 2005.
 29. Oliveira CC: Avaliação seqüencial da pele de coelhos imunizados com colágeno do tipo V. Monografia apresentada ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de especialista, 47 páginas, 2005.
 30. Callado MRM: Caracterização da resposta imune em modelo experimental de esclerodermia induzida por colágeno V. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 109 páginas, 2005.
 31. Bunn CC, Denton CP, Shi-Wen X, Knight C, Black CM: Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 37: 15-20, 1998.
 32. Igarashi A, Takehara K, Soma Y, Kikuchi k, Ishibashi Y: Clinical significance of antinuclear antibodies in japanese patients with systemic sclerosis. *Dermatologica* 180: 136-140, 1990.