UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CINTIA KAZUKO TOKUHARA

Mecanismos induzidos por leucotrienos na condição de artrite

BAURU
2021

CINTIA KAZUKO TOKUHARA

Mecanismos induzidos por leucotrienos na condição de artrite

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Biologia Oral, Estomatologia, Radiologia e Imaginologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Versão Corrigida

BAURU
2021

Tokuhara, Cintia Kazuko
Mecanismos induzidos por leucotrienos na condição de artrite / Cintia Kazuko Tokuhara. -- Bauru, 2021.
161 p.: il.; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 007/2017
Data: 18/08/2017

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada e defendida por
CINTIA KAZUKO TOKUHARA
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 01 de junho de 2021.

Prof.ª Dr.ª **FLÁVIA AMADEU DE OLIVEIRA**
HMS

Prof. Dr. **WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI**
UNESP

Prof.ª Dr.ª **MARILIA AFONSO RABELO BUZALAF**
FOB-USP

Prof. Dr. **RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA**
Presidente da Banca
FOB - USP

Izabel Regina F. Rubira Bullen

Profª. Drª. **Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: posgrad@fob.usp.br – Fone/Fax (0xx14) 3235-8223
http://www.fob.usp.br

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a pessoa mais importante da minha vida... Mãe, obrigada por toda dedicação comigo e com meus irmãos. Não tenho palavras para descrever tamanha gratidão. Você sempre será meu porto seguro, a pessoa que mais admiro e respeito. Obrigada pela vida!!!

A minha família... meu pai, minhas irmãs, meu irmão e minha cunhada por todo suporte durante a minha jornada.

Aos meus sobrinhos....
Amo vocês como se fossem meus filhos e torço para que vocês alcancem todos os seus objetivos e sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos “#cellcultureteam” ou “rodriguetes”
A amizade, parceria e companheirismo que construímos ao longo do curso foram essenciais para minha jornada, com vocês os dias se tornaram mais alegres e a pressão da pós graduação, mais ameno. O mais importante, entretanto, foi ser integrante de uma equipe unida e harmoniosa onde muitos já seguiram outros caminhos, mas, o sentimento de equipe ainda continua presente (Flávia Amadeu, Adriana Arruda Matos, Gabriela Silva Neubern de Oliveira, Mariana Liessa Rovis Sanches, Mariana Rodrigues Santesso, João Paulo Domezi, Adriano de Souza Pessoa, Vanessa Svízzero Fakhoury, Ana Lígia Pagnan, Kelly Karina Inácio, Fernanda César dos Santos). Agradeço a cada um de vocês pelos dias intensos de experimentos, mas também pelos dias descontraídos. Quando percorremos um longo caminho juntamente com aqueles que possuem os mesmos objetivos e com o espírito de equipe presente, certamente seguiremos mais longe e alcançaremos nossos propósitos com melhores resultados.

Aos antigos e novos amigos do Departamento de Ciências Biológicas e em especial ao Laboratório de Bioquímica da FOB – USP que direta ou indiretamente participaram da minha jornada, obrigada pelos momentos compartilhados.

A especialista do Laboratório de Bioquímica – Thelma Lopes da Silva, obrigada por não medir esforços em nos auxiliar, por todas as instruções durante essa minha trajetória na FOB/USP, foi um período de muita aprendizagem. Agradeço pela amizade, pelos conselhos e pelas conversas nesses anos de lab. Você é uma pessoa muito querida.

A especialista de laboratório, Larissa Tercília Grizzo Thomassian, obrigada por toda ajuda e disposição no espectrômetro de massas. Sem a sua ajuda e compreensão não conseguiria finalizar no tempo proposto. Obrigada pelas conversas descontraídas... conversar com você é sempre uma aprendizagem.

A querida amiga Talita Mendes da Silva Ventura

Uma amiga que a FOB me presenteou. Agradeço de coração por toda atenção, dedicação e parceria nos ensaios e análise proteômica. Foram dias de muito trabalho e aprendizagem. Você sempre será uma pessoa especial pra mim e desejo tudo de melhor na sua vida.

Ao amigo Prof. Dr. José Burgos Ponce

Pepe, obrigada por “embarcar” nesse projeto conosco. Por aceitar a proposta de parceria e dedicar-se ao projeto mesmo com tantos compromissos. Sua experiência e considerações foram fundamentais para o desenvolvimento do projeto. A pesquisa nos uniu, mas o que mantem o vínculo, é o sentimento de amizade e gratidão. Que venham outros congressos, muitas viagens e ópera, “of course”...rsrsrs

A querida amiga Mariana Liessa Rovis Sanches

Uma amiga que a pós graduação me presenteou, e que sempre tem uma história engraçada para contar... obrigada pela dias descontraídos e por toda ajuda no meu projeto. Que você continue sempre sendo essa pessoa divertida e bondosa. Você merece tudo de melhor.

A querida amiga Gabriela Silva Neubern de Oliveira

Iniciamos essa jornada juntas e agradeço por toda ajuda. Foram dias difíceis, mas com certeza, valeram a pena. Obrigada pelos dias descontraídos, pelas palavras de incentivo... Desejo o melhor pra ti, Gabi. Que você alcance todos os seus sonhos!!!

A querida amiga Mariana Rodrigues Santesso

Mesmo você não estando mais no nosso grupo, construímos uma bela amizade e o espírito de equipe permanece entre nós. Obrigada Mari, suas habilidades artísticas, com certeza, contribuíram positivamente ao presente trabalho.

Ao amigo Adriano de Souza Pessoa

Sua experiência no manejo dos camundongos, com certeza, foi de grande ajuda, pois, facilitou o dia a dia no biotério. Obrigada por estar sempre pronto para colaborar!!!

Ao amigo Rafael Carneiro Ortiz
Rafa, agradeço imensamente por toda sua colaboração e dedicação com o meu projeto. Que você continue essa pessoa humilde, divertida e de extrema bondade. Saiba que estarei sempre torcendo pelas suas conquistas! Que a nossa parceria dure por muitos anos e que venham novos projetos...

Aos funcionários do Biotério da FOB – USP, Luíz Carlos da Silva e Erasmo Gonçalves da Silva, pela atenção, paciência e por estarem sempre dispostos a nos auxiliarem durante o período de experimentos no Biotério.

Aos funcionários do Biotério da FCFRP – USP, Ronaldo e Fábio, pela atenção e disposição prestadas quando solicitados.

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa – CIP, Rafaela Alves e Marcelo Milanda por toda ajuda no CIP e companheirismo, em especial a Márcia Graeff, pela amizade e por toda sua alegria, conversar com você é viajar pelo mundo.

A coordenação do Centro Integrado de Pesquisa – FOB/USP
Profa. Dra. Ana Flávia Borges Sanches e Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães, obrigada por permitir que o CIP seja uma segunda casa para os pós-graduandos. Foram dias intensos de trabalho...

Ao Laboratório de Histologia da FOB – USP
Agradeço as técnicas Patrícia Germino e Daniele Ceolin, que indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste projeto, pela paciência e simpatia.

A secretária do Departamento de Ciências Biológicas
Dalva Ribeiro de Oliveira, muito obrigada por toda atenção dedicada a nós alunos, pela paciência e presteza de sempre. Tenho certeza que você é uma das pessoas mais queridas da universidade. Agradeço por sempre tentar agilizar a burocracia dos documentos, mas principalmente por ser essa pessoa humanitária e cuidadosa com os alunos. Você é demais.

A secretária Maria Teresa de Almeida Freitas
Tê, obrigada por toda atenção conosco. Mesmo com pouco tempo de convivência, agradeço por sempre estar disposta a nos ajudar e auxiliar.

Aos meus amigos do eterno *coffee cip*
Flávia Amadeu, Priscila Salomão, Heliton Lima, Karen Pinke, Nara Lígia, Gabriela Neubern, Pepe Burgos e Adriana Matos, vocês são muito queridos, construímos uma amizade para a vida e mesmo com a distância, tenho certeza que o sentimento de amizade é recíproco.

Ao “new friend”
Vimal Veeriah, uma pessoa divertida que a pesquisa científica nos presenteou e com certeza contribuiu muito no projeto. Muitos congressos estão por vir.

A amiga Thaís Francine Garbieri
Mesmo com pouco tempo de convivência na universidade, a distância nos uniu e me presenteou com sua amizade. E diante de um ano atípico e pandêmico, nossa amizade se fortaleceu e tive o privilégio de conhecer essa pessoa bondosa, inteligente e divertida. Obrigada pelos dias descontraídos na farmaco. Trabalhar contigo foi prazeroso.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica
Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães, obrigada por nós proporcionar esse excelente ambiente de trabalho na Bioquímica, pela parceria e por toda aprendizagem nesses anos de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro
Agradeço por permitir que usássemos o *scanner* para o *MicroCT*. Fui muito bem recebida pela sua equipe na Endodontia.

A Profa Dra Camila Peres Buzalaf
Apesar do pouco tempo de convivência, agradeço pelos dias nos quais pudemos conversar, onde você sanou minhas dúvidas e despertou em mim, profunda admiração.

A Ms Angélica Cristina Fonseca
Obrigada, Angélica por toda ajuda no raio X, mas também pelas conversas descontraídas e de incentivo. Você é muito querida.

Aos Professores do Laboratório de Histologia, Dr. Gustavo Pompermaier Garlet e Dra. Camila Rodini Pegoraro
Agradeço pela hospitalidade no laboratório e pelo uso dos equipamentos. Foram dias de muita aprendizagem.

A especialista de Laboratório Dra.Tânia Mary Cestari
Muito obrigada pela disponibilidade em sanar todas as minhas dúvidas. Conversar com você é sempre um aprendizado.

Ao Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
Agradeço a Maristela Petenucci e a Profa. Dra. Ana Paula Campanelli, por toda ajuda, paciência e disposição em sanar as nossas dúvidas.

Aos funcionários da FOB-USP e demais pessoas que colaboraram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho, contribuindo para que a minha trajetória pelo doutorado se tornasse mais alegre e leve.

Aos amigos da pós-graduação
Durante esses 7 anos de FOB/USP (mestrado/doutorado) tive o privilégio de conhecer pessoas de diferentes departamentos e Universidades. Alguns passaram rapidamente, outros permaneceram um pouco mais e muitos ainda continuam percorrendo seu caminho. Desejo a cada um de vocês, uma ótima jornada, que ela seja repleta de conquistas mesmo frente a tantas dificuldades, principalmente diante de um período atípico e pandêmico, que com certeza deixará muita aprendizagem.

Sejam persistentes e colaborativos, pois o espírito de equipe, quando presente no grupo, torna a pesquisa mais enriquecedora, possibilitando que se caminhe mais longe pois, um trabalho quando bem executado, possui o envolvimento de todo um grupo, e não apenas de um único pesquisador.

E por fim, mas não menos importante, a Deus
Obrigada por me proporcionar tanto, pelas bençãos, por me preparar para as adversidades da vida e simplesmente por me abençoar com essa família e pelos amigos que conquistei durante o meu percurso.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À *Faculdade de Odontologia de Bauru – USP,* na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos por proporcionar total suporte e estrutura. É uma honra fazer parte dessa instituição. Muitos tem o sonho de ser um uspiano e comigo não foi diferente... por isso, só tenho a agradecer essa instituição maravilhosa, que me recebeu de braços abertos e que tanto me proporcionou nesses anos de pós-graduação. Finalizo mais um ciclo nessa instituição com o sentimento de dever cumprido e gratidão por todos esses anos de intensa aprendizagem.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Obrigada pela concessão da bolsa no início do curso, pelo incentivo a pesquisa científica no nosso país.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da minha bolsa de doutorado (Processo Fapesp n° 2016/23736-0), pelo financiamento e apoio à pesquisa. Vocês são essenciais para o desenvolvimento e incentivo da pesquisa no nosso país. O estado de São Paulo, com certeza é privilegiado por ter uma agência de fomento tão competente, inovadora e incentivadora da pesquisa no Brasil. Diante de um período atípico e pandêmico no qual estamos vivenciando, vocês fizeram e fazem toda a diferença. Muito obrigada!!!!

Ao Centro Universitário de Adamantina (Unifai) pela parceria com o Prof. Dr. José Burgos Ponce e toda sua equipe, por toda dedicação e cuidado no processamento das amostras e consequentemente, no desenvolvimento do projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Á querida amiga Drª. Flávia Amadeu de Oliveira

Descrever em poucas palavras todo meu sentimento de gratidão seria impossível, pois construímos uma amizade que só fortaleceu nesses 7 anos de "convivência". Gostaria de usar as palavras mais bonitas para te agradecer por tudo..., pelos ensinamentos, por compartilhar conhecimentos e principalmente incentivar e inspirar-me a ser sempre uma pesquisadora melhor. Você sempre será a minha mestre ... e estarei torcendo sempre pelas suas conquistas e principalmente pela sua felicidade. Acredito que Deus coloca as pessoas certas no nosso caminho, por isso, sou muita grata por tê-la no meu.... percorrer esse longo percurso com a sua presença e amizade, certamente deixou-o menos sinuoso e mais prazeroso. Desejo de coração que a nossa parceria continue por muitos anos pois ainda tenho muito a aprender com você.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Obrigada por permitir que eu fizesse parte da sua equipe, pelo apoio, suporte e incentivo. Durante a minha trajetória na FOB/USP, tive a oportunidade de aprender, absorver e principalmente conviver com pesquisadores de "ponta". Foram 7 anos intensos de aprendizagem onde adquiri experiência profissional de excelência, mas também construí valiosos vínculos de amizade que levarei para a vida. Agradeço imensamente por me proporcionar todas essas experiências, serei sempre grata pela confiança depositada em mim, por aceitar e assumir esse projeto e acreditar no meu potencial para desenvolvê-lo. Muito obrigada! Foi uma honra fazer parte do seu time.

Aos queridos amigos Pepe Burgos e Rafael Ortiz

Não poderia deixar de expressar meu sentimento de gratidão as duas pessoas que contribuíram imensamente durante esse período pandêmico. Obrigada pelos dias intensos de trabalho, por sempre buscarem o melhor no desenvolvimento do projeto, pelas conversas enriquecedoras e pela disposição em sanar minhas dúvidas, mas, principalmente, por tornarem esses dias tensos de pandemia, mais amenos. A vida é assim, surpreendente... e quando você menos espera, pessoas das quais você não contava, te estendem a mão despretensiosamente. Obrigada, queridos, sem a colaboração de vocês, não teria conseguido finalizar esse projeto a tempo.

If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants.

Isaac Newton (1642 – 1727)

"Meu interesse nele era tão recente, e tão forte, e minha mente estava tão dividida entre o prazer e o lamento – prazer pela conclusão de um longo projeto, lamento por me separar de tantos companheiros".

David Copperfield – por Charles Dickens

RESUMO

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica, autoimune, que afeta principalmente as articulações. Apresenta como manifestações clínicas, edema e eritema nas articulações, dor que com a progressão da doença, promovem alterações importantes na arquitetura articular e diminuição e/ou perda de função. Patologicamente, ocorre hiperplasia da membrana sinovial, formação de *pannus*, presença de células do sistema imune e consequentemente, liberação de quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias. Os leucotrienos, por sua vez, são mediadores lipídicos, derivados do metabolismo do ácido araquidônico e sintetizados pela via 5-lipoxigenase (5-LO), apresentando um papel importante na resposta inflamatória tecidual e na defesa do hospedeiro contra vários patógenos. O leucotrieno B_4, é um potente quimioatrativo de neutrófilos, pois promove a adesão dessas células para o endotélio vascular, promovendo o desenvolvimento da artrite. O presente trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos envolvidos pelos leucotrienos, na artrite induzida em animais *knockout* para 5-LO (5-LO KO) e *wild type* (WT). Utilizando o modelo experimental de artrite reumatoide induzida por anticorpos de colágeno (*Collagen Antibody-Induced Arthritis* - CAIA), camundongos 5-LO KO e WT foram imunizados via veia caudal, com um coquetel de 5 tipos de anticorpos monoclonais contra o colágeno tipo II, no dia 0, seguido por administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) nos dias 3 e 11. O tampão fosfato-salino (PBS) foi utilizado como veículo nos grupos controles. Os animais foram monitorados e a progressão da doença foi avaliada diariamente por 14 dias. No décimo quarto dia, os camundongos foram eutanasiados e as patas coletadas para os ensaios de coloração com hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de masson, imunoexpressão por imunohistoquímica e imunofluorescência e análise proteômica. Os resultados demonstraram que o grupo WT CAIA desenvolveu uma sinovite moderada, ao analisarmos as patas dianteiras, em contrapartida, o grupo 5-LO KO CAIA, deficiente de leucotrienos, não desenvolveu a doença. Análises de imunoexpressão de marcadores inflamatórios e vasculares revelaram maior expressão da interleucina IL-1β e CD31 no grupo WT CAIA, entretanto não houve diferença na expressão de IL-6 e CD34 entre os grupos avaliados. Em relação ao perfil proteômico, mudanças significativas foram encontradas na identificação das proteínas totais na comparação

entre os grupos experimentais e controles, como proteínas relacionadas a produção de colágeno e presentes no processo inflamatório. Adicionalmente, proteínas exclusivas no grupo 5-LO foram identificadas, consideradas antioxidantes, nos direcionando a hipótese de que essas proteínas estariam sim, envolvidas no não desenvolvimento da sinovite nos camundongos *knockout.*

Palavras-chave: Artrite reumatoide. Leucotrienos. 5-Lipoxigenase.

ABSTRACT

Mechanisms induced by leukotrienes in arthritis condition

Rheumatoid arthritis is a chronic, autoimmune inflammatory disease that mainly affects the joints. Clinical manifestations are swelling in the joints, erythema, and pain that, with disease progression, promote important changes in joint architecture and decrease and/or loss of function. Pathologically, occurs hyperplasia of the synovial membrane, formation of *pannus*, presence of several cells of the immune system, and consequently, the release of chemokines and pro-inflammatory cytokines. On the other hand, leukotrienes are lipid mediators, derived from arachidonic acid metabolism and synthesized by the 5- lipoxygenase (5-LO) pathway playing an important role in the inflammatory tissue response and the defense of the host against various pathogens. Leukotriene B4, for example, is a potent neutrophil chemoattractive, as it promotes adhesion of these cells to the vascular endothelium, promoting or developing arthritis. Thus, the present study aimed to investigate the mechanisms involved by leukotrienes, in arthritis induced in mice *knockout* for 5- lipoxygenase. Using the CAIA model, *wild type and* 5-LO KO mice were immunized via the caudal vein, with a cocktail of 5 monoclonal antibodies against type II collagen on day 0, and double intraperitoneal injection of LPS on days 3 and 11. PBS was used as a vehicle in the control groups. On the fourteenth day, the mice were euthanized and the paws were collected for HE staining and Masson trichrome assays, immunoexpression by immunohistochemistry, and immunofluorescence, as well as proteomic analysis. Our results showed that the WT CAIA group developed moderate synovitis, in contrast, the *knockout* group, KO CAIA, deficient in leukotriene, did not present the disease. The immunoexpression of interleukin IL-1β was positively higher in the WT CAIA group, however, there was no difference for IL-6. In addition, the immunostaining for CD31 was also more expressive in the WT CAIA group compared to the other groups and there was no significant difference for CD34. Regarding the proteomic profile, significant changes were found in the identification of total proteins in the comparison between experimental and control groups, as proteins related to collagen production and present in the inflammatory process. Furthermore, antioxidant proteins exclusive to the 5-LO group were identified, leading us to the hypothesis that these proteins would indeed be involved in the non-development of synovitis in knockout mice.

Keywords: Rheumatoid arthritis. Leukotrienes. 5-Lipoxygenase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imagem ilustrativa demonstrando uma articulação saudável (A) e outra com artrite reumatoide (B). Verifica-se a formação de *pannus* articular, presença de células do sistema imune no ambiente inflamado, espessamento da membrana sinovial e erosão óssea pelos osteoclastos, típico na artrite reumatoide 26

Figura 2. Esquema demonstrativo e resumido da cascata do ácido araquidônico (AA)..... 32

Figura 3. Os camundongos das linhagens 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO) provenientes do Laboratório The Jackson – USA, foram mantidos no Biotério FCFRP – USP. Após aprovação da CEUA, protocolo n° 007/2017, os camundongos foram transferidos para o Biotério da FOB – USP, onde permaneceram por 7 dias, para adaptação do ambiente, sendo mantidos 3 camundongos por caixa do tipo microisolador e separados em 4 grupos, 129/Sv (WT C) e 5- LO KO (KO C) controles e 129/Sv (WT CAIA) e 5- LO KO (KO CAIA) (artrite induzida)..... 45

Figura 4. Esquema demonstrativo da indução ou não da artrite nos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO). Inicialmente foi realizado a aplicação do coquetel indutor da artrite – Chondrex, via veia caudal (grupo CAIA) ou PBS (grupo controle), no dia 0. No dia 3, os mesmos receberam um reforço intraperitoneal de LPS ou PBS, repetindo-se no dia 11, conforme instruções do fabricante. Diariamente, as patas anteriores e posteriores foram mensuradas com paquímetro. E no dia 14, os animais foram eutanasiados e as amostras coletadas para os ensaios 47

Figura 5. Peso médio em gramas dos grupos, WT CAIA (A), WT C (B), KO CAIA (C) e KO C (D) respectivamente, correspondente ao dia 0 (coquetel Chondrex – indutor da artrite para os grupos CAIA e solução PBS para os grupos controles) e dia 14 (eutanásia).

Podemos verificar que o peso dos animais não apresentou alteração entre os grupos CAIA e C 57

Figura 6. Avaliação clínica da atividade da artrite nas patas anteriores dos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO), CAIA e controles. O edema foi mensurado diariamente por meio de paquímetro e os resultados estão expressos em mm, período de 14 dias 58

Figura 7. Avaliação clínica da atividade da artrite nas patas posteriores dos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO), CAIA e controles. O edema foi mensurado diariamente por meio de paquímetro e os resultados estão expressos em mm, período de 14 dias ..... .58

Figura 8. Sinais clínicos da atividade da artrite nas patas posteriores (A) e anteriores (B) dos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO). Podemos verificar edema e eritema acentuados nas patas posteriores e anteriores dos animais WT CAIA, diferentemente do grupo KO CAIA..... 59

Figura 9. Características histopatológicas representativas em cada um dos grupos de estudo (WT C, WT CAIA, KO C e KO CAIA), correspondentes a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM) CA: cavidade articular; CF: cápsula fibrosa; MS: membrana sinovial; OE: osso esponjoso; Ca: cartilagem articular; Ce: cartilagem epifisária; H: hiperplasia de membrana sinovial; I: infiltrado inflamatório; P: *Pannus*..... 61

Figura 10. Características histopatológicas no score de sinovite. Em A (HE) e C (TM): Imagens representativas dos achados encontrados nos grupos WT C, KO C e KO CAIA; sem sinovite (GI=0). CA: cavidade articular; CF: cápsula fibrosa; MS: membrana sinovial; OE: osso esponjoso; Ca: cartilagem articular; Ce: cartilagem epifisária. Em B (HE) e D (TM): Imagens representativas dos achados encontrados no grupo WT CAIA; sinovite moderada (GI=2). H: hiperplasia de membrana sinovial; I: infiltrado inflamatório; P: *Pannus*..... 63

Figura 11. Cortes histológicos de tecido sinovial com imunomarcação de IL-1β, contracoloração com hematoxilina. (A) grupo WT C; (B) grupo WT CAIA; (C) grupo KO C; e (D) grupo KO CAIA. CA: cavidade articular; MS: membrana sinovial; Ca: cartilagem articular; TO: tecido ósseo; CF: cápsula fibrosa; H: hiperplasia da membrana sinovial; I: infiltrado inflamatório..... 67

Figura 12. Cortes histológicos de tecido sinovial com imunomarcação de IL-6, contracoloração com hematoxilina. (A) grupo WT C; (B) grupo WT CAIA; (C) grupo KO C; e (D) grupo KO CAIA. CA: cavidade articular; MS: membrana sinovial; Ca: cartilagem articular; TO: tecido ósseo; CF: cápsula fibrosa; H: hiperplasia da membrana sinovial; I: infiltrado inflamatório..... .69

Figura 13. Quantificação da imunoexpressão de interleucinas, IL-1β (A) e IL-6 (B) entre os grupos controles WT C e KO C, e experimentais WT CAIA e KO CAIA. One-way ANOVA complementado com o teste de Tukey (means + SD). GraphPad Prisma 5. ** p<0.005 71

Figura 14. Correlação positiva entre as interleucinas IL-1β e IL-6 nos grupos WT C (A), WT CAIA (B), KO C (C) e KO CAIA (D). Nos grupos WT C e KO CAIA foi possível observar que a imunoexpressão das citocinas foi homogênea entre os animais, no entanto esse padrão não se manteve nos animais WT CAIA e KO C. Coeficiente de correlação de *Spearman*, GraphPad Prisma 7..... 71

Figura 15. Fotomicrografias representativas de microscopia fluorescência de seções de tecido sinovial. (C e G-H; A, E-F). Imagens representativas dos grupos sem manifestação de AR: marcação de imunofluorescência para CD31 (verde) e CD34 (vermelho) com contra coloração DAPI (azul) para núcleos, respectivamente. D e B, imagens representativas do grupo com manifestação de AR: marcação de imunofluorescência para CD31 (verde) e CD34 (vermelho) com contra coloração DAPI (azul) para núcleos 75

Figura 16. Análise comparativa da intensidade de fluorescência para CD31 (A) e CD34 (B) entre os grupos controles WT C e KO C, e experimentais WT CAIA e KO CAIA. One-way ANOVA, com pós teste de *Tukey* (means + SD). GraphPad Prisma 5. *, # p<0.05 77

Figura 17. Diagrama de Venn representando as proteínas exclusivas de cada grupo e nas intersecções, as proteínas em comum, identificadas na análise proteômica das patas anteriores e posteriores dos quatro grupos, WT CAIA – Wild type com artrite induzida; WT C – Wild type controle; KO CAIA – 5-LO KO com artrite induzida; KOC – 5-LO KO controle (Bioinformatics & Evolutionary Genomics)..... 79

Figura 18. Gráfico da distribuição funcional em porcentagem, das proteínas identificadas com expressão diferencial na comparação WT CAIA vs WT C. Categoria de proteínas baseadas na ontologia genética (GO) do amplo Processo do Sistema Imune. Significância (Kappa= 0.04) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes associados. A ontologia genética foi avaliada segundo os pluggins ClueGo® v.2.5.7 do software Cytoscape® 3.8.2. 125

Figura 19. Gráfico da distribuição funcional em porcentagem, das proteínas identificadas com expressão diferencial na comparação KO CAIA vs KO C. Categoria de proteínas baseadas na ontologia genética (GO) do amplo do Sistema Imune. Significância (Kappa= 0.04) e distribuição de acordo a porcentagem do número de genes associados. A ontologia gênica foi avaliada segundo os pluggins ClueGo® v.2.5.7 do software Cytoscape® 3.8.2 126

Figura 20. Gráfico da distribuição funcional em porcentagem, das proteínas identificadas com expressão diferencial na comparação KO CAIA vs WT CAIA. Categoria de proteínas baseadas na ontologia genética (GO) do amplo Processo do Sistema Imune. Significância (Kappa= 0.04) e distribuição de acordo a porcentagem do número de genes associados. A ontologia gênica foi avaliada segundo os pluggins ClueGo® v.2.5.7 do software Cytoscape® 3.8.2 127

Figura 21. Gráfico da distribuição funcional em porcentagem, das proteínas identificadas com expressão diferencial na comparação KO C vs WT C. Categoria de proteínas baseadas na ontologia genética (GO) do amplo Processo do Sistema Imune. Significância (Kappa= 0.04) e distribuição de acordo com a porcentagem de número de genes associados. A ontologia genética foi avalizada segundo os plugins ClueGo® v.2.5.7 do software Cytoscape® 3.8.2 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Score histopatológico da sinovite segundo Krenn et al (2002), com parâmetros de graduação, 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (intenso/forte). Os valores de todos os parâmetros são contabilizados e adicionados, variando de 0 a 9. 0 – 1: sem sinovite, grau inflamatório (GI) = 0; 2 – 3: ligeira sinovite, GI = 1; 4 – 6: sinovite moderada, GI = 2 e 7 – 9: sinovite forte, IG = 3 47

Tabela 2. Tabela demonstrativa do escore qualitativo adotado para avaliar a severidade do edema das patas, segundo o fabricante Chondrex, Inc. 60

Tabela 3. Proteínas com expressão significativamente alteradas no grupo WT CAIA (camundongos com artrite induzida) em comparação com o grupo controle WT C 82

Tabela 4. Proteínas com expressão significativamente alteradas no grupo KO CAIA (camundongos com artrite induzida) em comparação com o grupo controle KO C..... 93

Tabela 5. Proteínas com expressão significativamente alteradas no grupo KO CAIA em comparação com o grupo WT CAIA, ambos com artrite reumatoide induzida 104

Tabela 6. Proteínas com expressão significativamente alteradas no grupo KO C em comparação ao grupo WT C, ambos grupos controles, sem indução da artrite reumatoide..... 115

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µA	Microampère
µCT	MicroCT ou Micro tomografia
µg	Micrograma
µg/mL	Microgramas por Mililitro
µgmol	Micromol
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
ACN	Acetronitrila
Alox5	*Arachidonate 5-lipoxigenase Gene*
AMBIC	Bicarbonato de Amônio
BSA	*Bovine Serum Albumin*
CAIA	*Collagen Antibody Induced Arthritis*
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CysLTs	Cisteinil Leucotrieno
Da	Dalton
DAB	3,3'diaminobenzidine
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DAPI -	4',6-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride
DTT	*Dithiothreitol*
FLAP	Proteína Adaptadora da 5-LO
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
kV	Kilovolt
LPS	*Lipopolysaccharides*
LT -	Leucotrienos
LTB_4	Leucotrieno B_4

LTC_4	Leucotrieno C_4
LTE_4	Leucotrieno E_4
Mg/mL	Miligramas por Mililitro
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
PAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PBS	*Phosphate Buffer Saline* (Tampão Fosfato-Salina)
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PLA	Fosfolipase A2
pmol/ µL	Picomol por Mililitros
ppm	Partes por Milhão
RPM	Rotação por minuto
TA	Temperatura Ambiente
TBS	Tween 20
TFA	Ácido Trifluoracético
UNIPROT	*Universal Protein Research*
V	Volt
WT	*Wild Type*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
2 REVISÃO DE LITERATURA 31
2.1 Tecido Ósseo e Articulação 31
2.2 Eicosanoides 32
2.3 Leucotrienos e sua biossíntese 33
2.4 Processo inflamatório 34
2.5 Aspectos etiológicos da artrite reumatoide 36
2.6 Fisiopatologia da artrite reumatoide 37
3 JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO 41
4 MATERIAL E MÉTODOS 45
4.1 Animais 45
4.2 Indução e avaliação da artrite reumatoide 46
4.3 Processamento das amostras e preparo das lâminas – HE, TM, IHQ e IF 48
4.4 Imuno-histoquímica 48
4.4.1 Análise da Imuno-histoquímica 49
4.5 Imunofluorescência 50
4.5.1 Análise da Imunofluorescência 51
4.6 Espectrometria de massas 51
4.6.1 Preparo das amostras 51
4.6.2 Aquisição nano LC-ESI-MS/MS 53
4.6.3 Quantificação livre de marcadores 53
4.6.4 Análise de Bioinformática 54
4.7 Análise estatística 54
5 RESULTADOS 57
6 DISCUSSÃO 131
7 CONCLUSÃO 143
REFERÊNCIAS 147
ANEXOS 159

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por uma inflamação crônica, apresentando como característica, uma deformação e progressiva destruição das articulações[1, 2].

A incidência da AR na população mundial, apresenta-se em torno de 0.5 – 1.0% dos adultos[3, 4], e a prevalência, por sua vez, é maior em mulheres acima dos 40 anos, entretanto mais comumente em idosas, numa relação de 2 a 3 vezes maior nas mulheres do que nos homens[2]. Tal frequência poderia estar relacionado à possível influência hormonal no processo inflamatório causador da AR [5-7].

Recentemente Almutairi e colaboradores (2020)[8], investigaram por meio de uma metanálise, a prevalência global da artrite reumatoide e baseado na prevalência combinada por continentes entre países, verificaram que essa prevalência foi mais elevada na América do Norte, correspondendo a 0.70%, seguido da Europa com 0.54% e África com 0.52%. A menor prevalência foi encontrada na Ásia e América do Sul, ambos com 0.30%. Adicionalmente, ao considerarem o nível de prevalência no país, Cuba foi o país que apresentou maior porcentagem, com 2.67%, seguido da Finlândia com 1.90% e Lesoto com 1.80%. Em contrapartida, a menor prevalência foi reportada na Nigéria, com 0%, seguido de Taiwan 0.05 – 0.12% e Tailândia com 0.12%. No Brasil, a prevalência fica em torno de 0,2% à 1%[9, 10].

Estudos demonstram que na AR, 60% dos fatores de risco estão relacionados à genética, ou seja, susceptibilidade genética (HLA-DRB1) e modificações epigenéticas, e 40% a fatores não genéticos como, tabaco, microbiota, gênero (feminino), dieta (ocidental) e fatores étnicos[11].

A etiologia da AR ainda é desconhecida, mas sabe-se que há o envolvimento de múltiplos mecanismos e excessiva reabsorção óssea subcondral por osteoclastos. Gatilhos ambientais desconhecidos parecem ativar a imunidade inata, induzindo a respostas imunes adaptativas que podem ser identificadas pela produção de autoanticorpos (como por exemplo, o fator reumatoide) ou anticorpos anti-pepitídeos citrulinados (anti-CCP). Com o decorrer dos anos, tem-se uma resposta inflamatória específica das articulações, levando ao início clínico[12-14].

Patologicamente, ocorre a hiper proliferação da membrana sinovial e acúmulo de células T ativadas e macrófagos, levando à degradação da cartilagem e erosão óssea nas articulações[15]. Segundo consta na literatura, as características patológicas da AR incluem inflamação, inchaço sinovial, formação de *pannus*, rigidez das articulações e destruição da cartilagem articular. O foco, entretanto, da maioria dos pesquisadores, está na destruição da cartilagem e inflamação da membrana sinovial[16] (**Figura 1**).

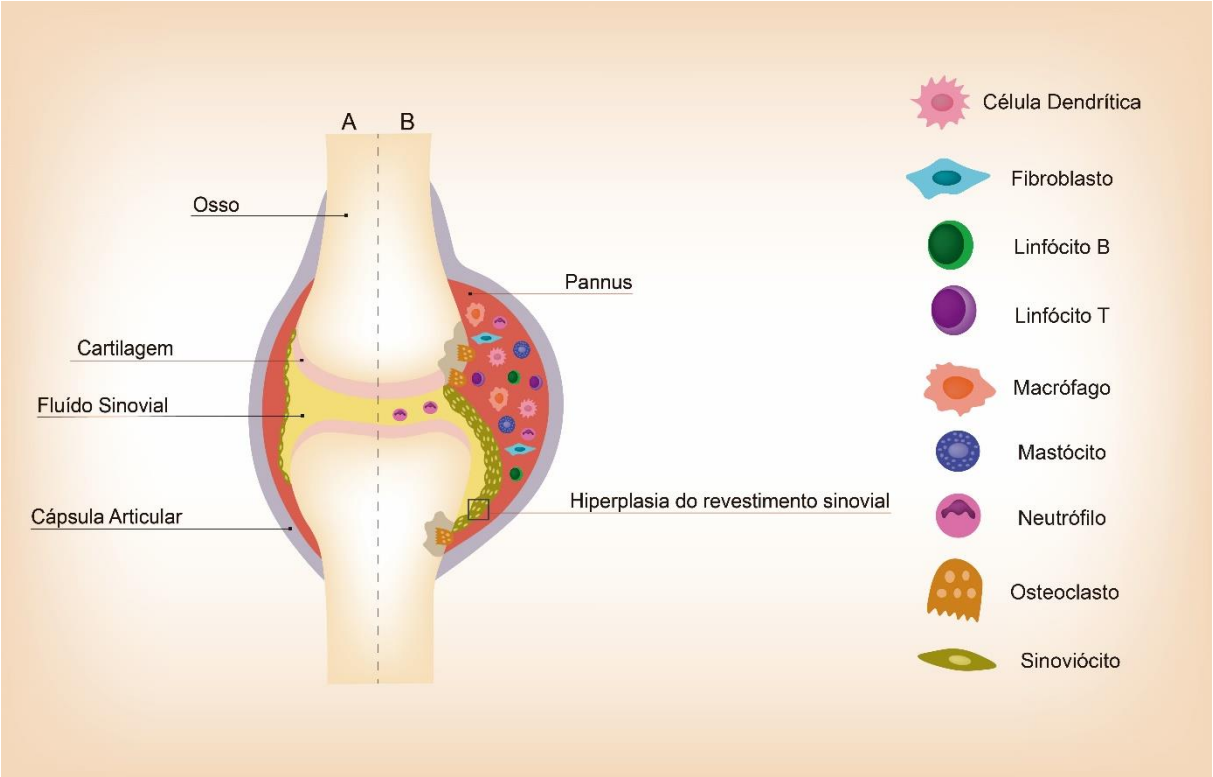


Figura 1. Imagem ilustrativa demonstrando uma articulação saudável (**A**) e outra com artrite reumatoide (**B**). Verifica-se a formação de *pannus* articular, presença de células do sistema imune no ambiente inflamado, hiperplasia do revestimento sinovial e erosão óssea pelos osteoclastos, típico na artrite reumatoide.

Por outro lado, sabe-se que os lipídios bioativos derivados dos ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido araquidônico (AA) desempenham um papel essencial na regulação da inflamação. O AA é liberado pelos fosfolipídeos presentes na membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A2 (cPLA2), ativando a via das ciclooxigenases (COX) e a via das lipoxigenases (LOX), está última, responsável pela produção de leucotrienos (LTs). As COXs, produzem prostaglandinas (PGs), incluindo PG2, prostaciclinas e tromboxano A2, que podem estimular a reabsorção óssea *in vitro* e regular a formação óssea *in vivo* e *in vitro* [17] [18].

Os LTs, por sua vez, são mediadores lipídicos derivados do metabolismo oxidativo do AA produzidos pela via 5-lipoxigenase, apresentando um papel importante na resposta inflamatória tecidual e na defesa do hospedeiro contra vários patógenos[19]. Dentre os tipos de LTs, LTB_4, LTC_4, LTD_4 e LTE_4, o B_4 é um potente quimioatrativo de neutrófilos, pois promove a adesão dessas células para o endotélio vascular, promovendo o desenvolvimento da artrite[18, 20].

A ação de LTB_4 foi amplamente estudada em várias condições inflamatórias e constitui um dos principais alvos de muitas doenças inflamatórias incluindo a perda óssea na artrite[21]. Segundo Bonewald et al (1997)[22], o efeito do LTB_4 estimula a reabsorção óssea tanto *in vitro* quanto em *in vivo,* e ao injetarem o LTB_4 na calvária de camundongos, perceberam um aumento da reabsorção óssea, no número de osteoclastos e superfície erodida.

Deste modo, a articulação de pacientes com AR é caracterizada por uma infiltração de células imune na região sinovial e uma rede diversa de sinais quimiotáticos possui a capacidade de recrutamento de leucócitos para o local inflamado, como quimiocinas, peptídeos bacterianos, fragmentos proteolíticos de complemento, lipídios e o LTB_4, por exemplo, é considerado um mediador quimioatraente altamente potente, um elemento chave nas reações inflamatórias imediatas, pois é produzido e liberado rapidamente pelos neutrófilos, macrófagos e mastócitos. Adicionalmente, a literatura aponta uma correlação entre níveis elevados de LTB_4 e a gravidade da doença, nas articulações de pacientes com AR[23, 24].

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo e Articulação

O osso é um tecido conjuntivo rígido, inflexível, que apresenta uma matriz extracelular (MEC) mineralizada, recoberta por sais de cálcio e fosfato. Além disso, o osso é altamente vascularizado e metabolicamente ativo, tendo como principais funções, o suporte e proteção do corpo e seus órgãos, além de ser um reservatório para íons cálcio e fosfato[25].

O tecido ósseo é constituído de 35% de componentes orgânicos e 65% de inorgânicos. A porção orgânica contém fibras colágenas tipo I (predominante na matriz óssea em 90%); proteoglicanos, ricos em sulfato de condroitina, queratan sulfato e ácido hialurônico; e proteínas não colagenosas, como osteocalcina, osteopontina e osteonectina, produzidas por osteoblastos[25, 26].

A porção inorgânica, por sua vez, é composta predominantemente por depósitos de fosfato de cálcio com características cristalinas da hidroxiapatita, sendo os cristais distribuídos ao longo das fibras colágenas, por meio de um processo associativo com a participação de proteínas não colagenosas[25, 26]. Adicionalmente, outras proteínas também são encontradas, em menores porções como, glicoproteínas, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento[27].

O osso apresenta-se de duas formas: osso compacto, uma massa sólida e osso esponjoso, que consiste em espículas ósseas ou trabéculas que delimitam espaços ocupados pela medula óssea[25]. Adicionalmente, os ossos são interconectados por articulações ou junturas que possibilitam o movimento. As diartroses ou articulações sinoviais, por exemplo, permitem o movimento livre, e apresenta uma cápsula que une as extremidades dos ossos, sendo revestida por uma membrana sinovial que envolve a cavidade articular ou sinovial, que contém um líquido que reduz o atrito entre a cartilagem hialina que recobre as superfícies articulares opostas. O líquido é uma combinação do produto das células sinoviais e do ultrafiltrado dos capilares, sendo esse liquido rico em ácido hialurônico, glicoproteínas e leucócitos[25].

Essa capsula articular, apresenta uma camada mais externa de tecido conjuntivo denso com vasos sanguíneos e nervos, e uma camada interna denominada membrana sinovial. A superfície interna da membrana sinovial é revestida por 1 – 2 camadas de células sinoviais que recobrem todo o tecido conjuntivo[25].

2.2 Eicosanoides

Os eicosanoides são um grupo de compostos bioativos e oxigenados, constituídos de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, apresentando de 18 – 22 carbonos. O maior precursor desses compostos é o AA, um ácido graxo que apresenta 20 carbonos em sua estrutura, e está presente em vários tipos celulares[28].

A cascata do AA ocorre por meio de duas vias principais: a via da COX dando origem aos prostanoides que incluem as prostaglandinas e tromboxanos; e a via da LOX, que por meio de sua ação serão produzidos os leucotrienos e lipoxinas[28] (**Figura 2**).

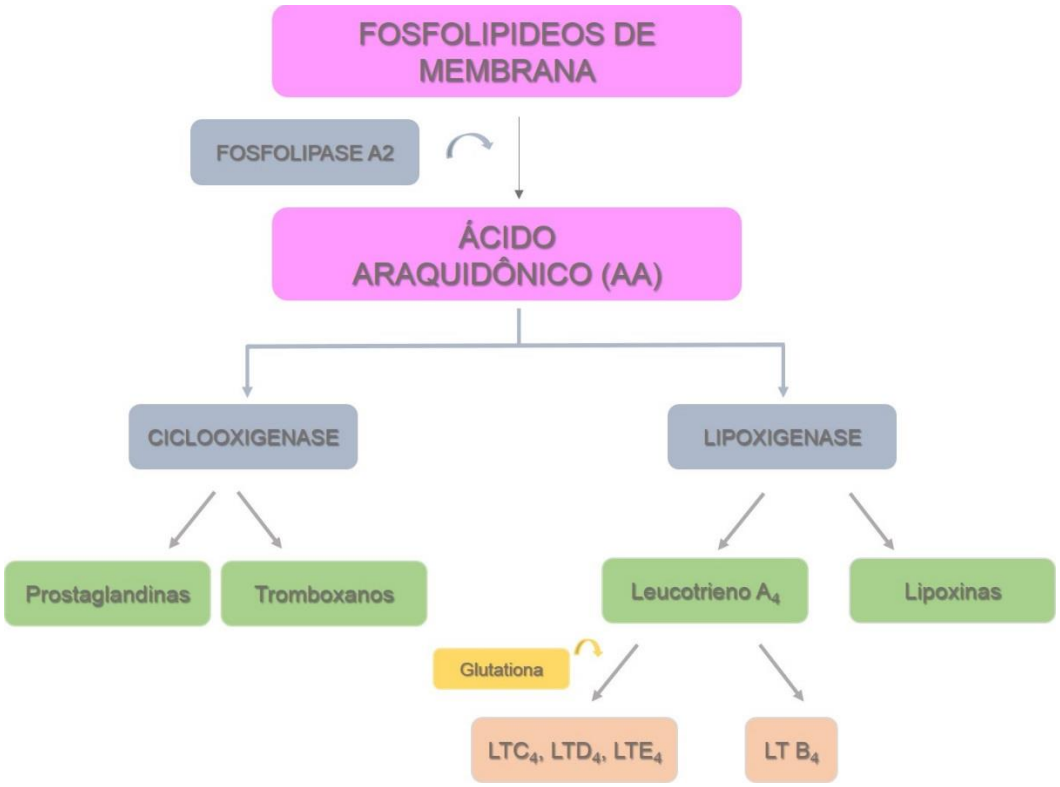


Figura 2. Esquema demonstrativo e resumido da cascata do ácido araquidônico (AA).

2.3 Leucotrienos e sua biossíntese

Os leucotrienos são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do AA, sintetizados na membrana nuclear em células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, em resposta a estímulos imunes e inflamatórios[29].

A 5-LO é uma das principais enzimas sintetizadoras dos LTs. Com o auxílio da proteína FLAP, ativadora de 5-LO, catalisa a reação que converte o AA em ácido hidroperoxieicotetraenóico (HPETE)[29, 30]. Uma reação de desidratação subsequente catalisada pela mesma enzima, 5-LO, resulta na formação de leucotrieno A_4 (LTA_4), o precursor quimicamente reativo de leucotrienos biologicamente ativos[28].

Em seu estado normal, 5-LO é uma enzima citosólica, entretanto após a sua ativação, se liga ao envelope nuclear para produzir leucotrienos. Vários fatores estão envolvidos na estimulação, ativação e transferência da 5-LO para o envelope nuclear, como Ca^{2+}, adenosina trifosfato (ATP), fosfatidilcolina e ROS em baixa concentração(31).

A biossíntese do leucotrieno dependerá da disponibilidade de AA como substrato para a 5-LO, que nesse momento, requer a ação da cPLA2α para liberar o AA dos fosfolipídios de membrana. Os leucotrienos, não são armazenados nas células, mas são rapidamente sintetizados e liberados após a ativação celular[28].

Uma vez sintetizado o leucotrieno intermediário instável A_4 (LTA_4), são derivados dois potentes produtos com atividades biológicas, pois o A_4 poderá ser hidrolisado em B_4 (LTB_4), conhecido como um fator quimiotático e ativador de neutrófilos, ou se conjugado com glutationa, produzirá cisteinil leucotrienos (CysLTs), como por exemplo, C_4 (LTC_4), D_4 (LTD_4) e E_4 (LTE_4)[28-30].

Tanto o LTB_4 quanto CysLTs apresentam suas ações mediadas pela via de receptores do tipo transmembrana acoplados a proteína G, denominado GPCRs (G protein-coupled receptors), podendo ser essa sinalização do tipo autócrina ou parácrina. O LTB_4 irá agir nos receptores BLT1 que sinaliza por meio das proteínas Gαi e Gαq, inibindo a adenilato ciclase e aumentando o influxo de cálcio, respectivamente; e BLT2, que traduz sinais intracelulares similares, entretanto, com menor afinidade de ligação, em relação ao BLT1. Os cisteinil leucotrienos, por outro

lado, apresentam dois tipos de receptores CysLT1 e CysLT2, e a sinalização induzida por ambos os receptores é mediada pelo influxo de cálcio, devido estes estarem acoplados a proteínas do subtipo Gαq[29, 30, 32].

Adicionalmente, esses receptores são expressos em diversas células alvo, como leucócitos, células musculares lisas, endoteliais e osteoblásticas[30]. O LTB_4, um potente mediador quimiotático do AA e responsável pelo recrutamento de leucócitos e amplificação da resposta inflamatória, encontra-se altamente presente no fluido sinovial e no soro de paciente com doenças osteoinflamatórias, como artrite reumatoide[33, 34].

Segundo a literatura, a enzima 5-LO (codificada pelo gene Alox5) é um regulador negativo da densidade óssea, sugerindo, portanto, um indutor de doenças osteodegenerativas, como osteoporose, artrite reumatoide e osteoartrite[34-36].

2.4 Processo inflamatório

A inflamação é um processo biológico complexo e essencial pois permite que o nosso corpo nos proteja de possíveis danos causados por infecção ou lesão. Para que essa resposta inflamatória seja eficaz, dependerá do envolvimento de interações celulares e moleculares entre o sistema imunológico, sistema vascular e o tecido, além de sinais clínicos como calor, rubor, edema, prejuízo funcional e dor. Esse processo tem como finalidade, a remoção do estímulo indutor da resposta, iniciando a recuperação tecidual local[37, 38].

Quando o processo inflamatório não é controlado de forma adequada, eventualmente pode-se resultar em doenças inflamatórias imunomediadas, (como por exemplo, artrite reumatoide, asma, doença inflamatória intestinal, entre outros), rejeição a transplantes e cicatrização de feridas prejudicada[38].

O sistema imune na tentativa de lidar com as infecções e lesões teciduais, estimula uma inflamação aguda, consequentemente, acarretando no acúmulo de leucócitos, proteínas plasmáticas e fluido derivado do sangue em tecido extravascular, local de infecção e lesão. Os leucócitos e as proteínas plasmáticas, por sua vez, são

recrutados para os locais de infecção e lesão, onde atuam de maneira a combater os microrganismos e iniciar a reparação do tecido danificado[39].

O neutrófilo, por exemplo, é o leucócito mais abundante recrutado do sangue para os locais de inflamação aguda, entretanto os monócitos sanguíneos (futuros macrófagos no tecido) são fundamentais, uma vez que poderão tornar-se a população dominante em algumas reações. Outras proteínas plasmáticas também estão presentes na região inflamatória, como proteínas do complemento, anticorpos e reagentes de fase aguda[39].

A distribuição destes componentes para os locais inflamados é dependente de alterações reversíveis nos vasos sanguíneos dos tecidos infectados ou danificados. Essas alterações abrangem mudanças no fluxo sanguíneo para o tecido atribuídos à dilatação arteriolar, adesividade aumentada dos leucócitos circulantes para o revestimento endotelial das vênulas e permeabilidade aumentada dos capilares e vênulas às proteínas plasmáticas e fluidos. Essas alterações, por sua vez, são induzidas por citocinas e pequenas moléculas mediadoras, inicialmente derivadas das células residentes nestes tecidos, tais como os mastócitos, macrófagos e células endoteliais, em resposta à estimulação por PAMP (padrões moleculares associadas a patógenos) e DAMP (padrões moleculares associados a dano)[39].

No contexto inflamatório agudo, há predominância de elementos da resposta imune inata, sendo os neutrófilos e macrófagos, as principais células envolvidas. Por outro lado, na inflamação crônica, o processo inflamatório se mantém e sofre alterações qualitativas, caracterizadas por mudança progressiva nos elementos celulares e solúveis que infiltram o tecido. A permanência desse agente causador, cronifica o processo, levando concomitantemente a destruição e reparo tecidual. Além disso, o tecido apresenta características de um infiltrado constituído de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose[37, 39].

Adicionalmente, evidências apontam que as células mieloides contribuem de maneira essencial na inflamação, assim como para a resposta imunológica. Segundo Alivernini e colaboradores (2018)[40], as células mieloides são reguladores chave que impulsionam a resposta imune inata para dar suporte à inflamação imunológica crônica e de difícil reversão na AR.

2.5 Aspectos etiológicos da artrite reumatoide

Estudos demonstram que a AR é influenciada por fatores genéticos, ocorrendo maior susceptibilidade de desenvolvimento da doença em gêmeos (mono e dizigóticos) de irmãos acometidos pela doença[41]. Essa predisposição está relacionada a transferência na população de alelos de susceptibilidade que apresentam maior relação com a enfermidade, como os genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA), conhecidos como Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC)[42, 43].

Os alelos com HLA-DR1 (Antígeno leucocitário humano DR1) ou DR4 do MHC, por exemplo, estão presentes em 80% dos pacientes caucasianos com AR, entretanto outros alelos também estão envolvidos com a susceptibilidade da doença[43, 44].

Os genes do complexo MHC codificam moléculas de superfície celular que são responsáveis pela apresentação de antígenos às células T, levando a ativação celular. Os alelos HLA (DRI, por exemplo) expressam epítopos na fenda da molécula que serve de pontos de ligação para os autoantígenos da AR, o que estaria diretamente relacionado com o desenvolvimento da doença, isso justificaria o porquê da expressão de alguns alelos do MHC predispor ao desencadeamento da doença[45, 46]. Entretanto, há evidências de vários genes de susceptibilidade em pacientes com AR não relacionados ao MHC, como variantes dos genes *PTPN22 alelo 1858T* e *PAD14* e indicados como preditores para o desenvolvimento da AR, sendo esses ainda, relacionados a resposta imunológica[43, 47].

Devemos considerar ainda, a relação de fatores exógenos (ambientais) com a patogênese da enfermidade, como por exemplo, alterações nos hormônios sexuais, gravidez, periodontite, obesidade, tabagismo, agentes infecciosos (bactérias e vírus), etilismo, entre outros[45, 48-50].

A real origem da doença ainda permanece obscura pois, não se sabe com clareza a relação entre os fatores genéticos e ambientais, sobretudo levando em consideração a heterogeneidade da doença[41].

2.6 Fisiopatologia da artrite reumatoide

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica que apresenta manifestações clássicas, inicialmente com um processo proliferativo da membrana sinovial, inflamação, e consequentemente uma erosão da cartilagem articular e destruição do osso subjacente[25, 51].

O evento inicial ocorre devido a apresentação de um antígeno peptídico, as células T $CD4^+$, que liberam interleucina 15 com o intuito de ativar macrófagos sinoviais presentes na membrana sinovial. Consequentemente, os macrófagos sinoviais secretam citocinas pro inflamatórias como, fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina -1 (IL-1) e interleucina -6 (IL-6), para induzir a proliferação das células sinoviais que irão liberar colagenase, metaloproteinases de matriz extracelular, prostaglandinas e oxido nítrico dirigidas para destruição da cartilagem articular e o tecido ósseo subjacente[25].

Citocinas como TNF-α, IL-1 e IL-6, apresentam papel fundamental no direcionamento da inflamação na artrite reumatoide. O TNF- α e a IL-1, por exemplo, estão presentes no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide e ambos, estimulam as células sinoviais *fibroblastos-like*, além de osteoclastos e condrócitos para liberarem metaloproteinases de matriz que destroem a cartilagem do osso[25].

A literatura descreve ainda, a presença de uma variedade de autoanticorpos presentes tanto no soro quanto no liquido sinovial de pacientes com AR e sua especificidade está direcionada contra proteínas citrulinadas. Sugere-se, portanto, a presença de proteínas citrulinadas na região da membrana sinovial, uma vez que os anticorpos antiproteinas citrulinadas são produzidos nesse local[52].

A citrulina não é um aminoácido padrão, deste modo, sua presença é devido a uma modificação pós-traducional de proteínas contendo arginina catalisada pela enzima peptidilarginina deiminase (PADI). Sabe-se que macrófagos e granulócitos expressam PADI2, que em condições fisiológicas, encontra-se inativada devido à baixa concentração de cálcio intracelular. Durante a morte celular destas, devido a falhas nos processos homeostáticos, íons cálcio entram nas células, ativando a enzima PADI. Consequentemente, proteínas intracelulares como vimentina e histona, que são proteínas citrulinadas, podem migrar para o meio extracelular, ou até mesmo,

a própria enzima PADI pode extravasar e citrulinar proteínas extracelulares, como por exemplo, a fibrina. Deste modo, essas proteínas citrulinadas expostas ao sistema imunológico sob condições adjuvantes, no contexto de uma região sinovial inflamada, podem acarretar numa resposta imunológica específica[52]).

A compreensão da fisiopatologia da AR é complexa pois, há o envolvimento de inúmeras células cujas funções sofreram alterações por genes associados a AR e/ou gatilhos ambientais, convertidos em células e complexos autoimunes[53].

Dentre as citocinas mediadoras da inflamação desencadeadas a partir de atividades linfocíticas, fator de necrose tumoral (TNF-α) e as interleucinas IL-1 e IL-6, resultam em níveis crescentes de estresse oxidativo, parâmetros lipídicos também podem ser alterados e resistentes a potencial modificação[53].

Deste modo, proteínas presentes na circulação reumatoide encontram-se exacerbadas, sendo a artrite reumatoide, caracterizada pela predominância de proteínas de resposta de fase aguda, como por exemplo fibrinogênio, proteínas amilóides e globulinas sobre a albumina[53].

Alguns autores descrevem ainda que a AR é caracterizada por envelhecimento acelerado do sistema imunológico, incluindo insuficiência da atividade da telomerase, deficiência dos mecanismos de reparo do DNA, regeneração prejudicada de células T, diversidade contraída do repertório de células T e aumento da frequência de células T CD28 [54-56].

Adicionalmente, LTs e PGs são considerados mediadores inflamatórios com potente atividade biológica na patogênese de inúmeras doenças e a liberação desses mediadores modula e influencia a magnitude da resposta inflamatória. Além disso, mediadores lipídicos tendem estar aumentados em doenças ósseas receptivas, como osteoporose, artrite reumatoide, osteoartrite e periodontite[31, 57, 58] e níveis elevados de LTB_4 correlacionam com a severidade da doença[24].

3 JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO

3 JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO

A produção de LTs é estimulada em várias doenças inflamatórias que envolvem a reabsorção óssea como a AR, a osteoartrite e a periodontite. Segundo estudos, esses mediadores atuam na supressão da formação óssea por modularem a função de osteoblastos e osteoclastos, além de modular células endoteliais[34-36].

Por outro lado, a AR é uma doença que pode acometer qualquer pessoa, porém a incidência principal é em mulheres e idosos[59]. Com o aumento na expectativa de vida, o número de idosos não só no Brasil, mas como em todo o mundo é crescente.

Diante desse envelhecimento populacional, o aumento de doenças osteoarticulares é frequente, causando dor e restrições no movimento, impactando negativamente na qualidade de vida dessas pessoas[60]. Além disso, fatores influenciadores agravantes da doença inflamatória aumentaram consideravelmente e embora os LTs estejam envolvidos no processo inflamatório na artrite, pouco se sabe sobre a contribuição individual, nos parâmetros funcionais e moleculares, dessas células em regular a reabsorção óssea nessa condição.

Deste modo, entender os mecanismos pelos quais os LTs agem durante a condição de artrite será fundamental para trazer novas perspectivas de alvos terapêuticos para a essa doença. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel dos leucotrienos na artrite reumatoide induzida. Para isso foram avaliados:

- o desenvolvimento e progressão da artrite induzida em camundongos deficientes de leucotrienos (5-LO KO) e controle (WT-129/Sv);
- a identificação das proteínas totais envolvidas na condição de artrite, nos camundongos com deficiência de leucotrienos e controles;
- comparação histopatológica entre os camundongos 129/Sv e 5-LO KO;
- imunoexpressão de citocinas envolvidas na artrite reumatoide.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos fêmeas 129/Sv, *wild type* (WT) e Alox5^{tm1Fun} (5-LO KO), ambos com 8 semanas de idade, provenientes do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA) e mantidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP, Universidade de São Paulo foram transferidas para o biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP, onde permaneceram por um período de 7 dias para adaptação ambiental. Em seguida, iniciou-se o protocolo de indução de artrite, conforme descrito a seguir. Adicionalmente, todos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições durante todo o período experimental, recebendo água e ração *ad libitum*, temperatura de 23°C e período claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com as diretrizes do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOB/USP (CEUA Proc. N° 007/2017) (**Figura 3**).

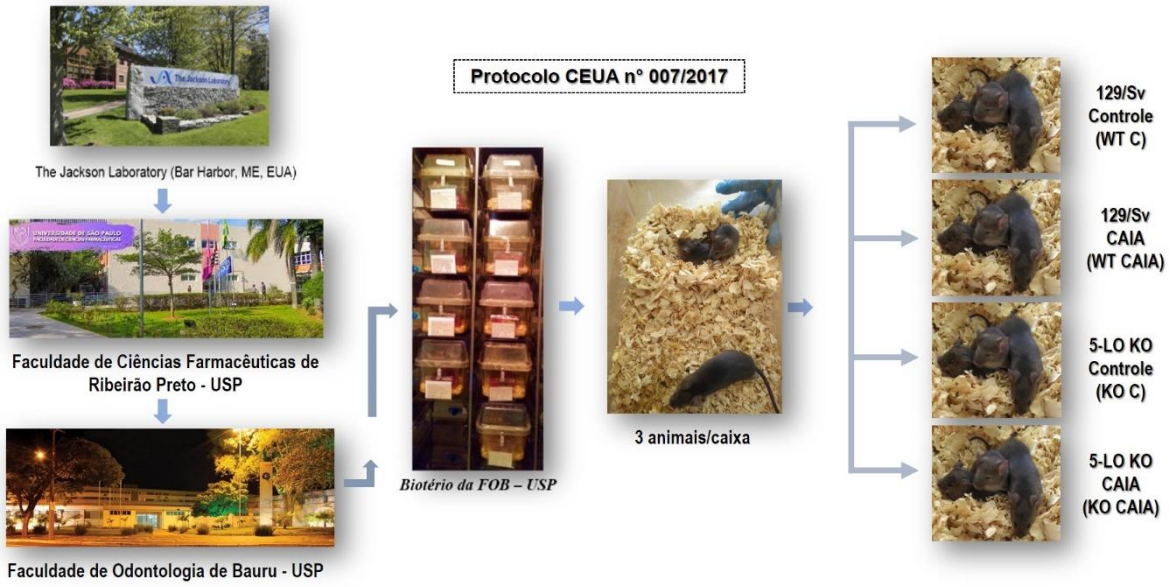


Figura 3. Os camundongos das linhagens 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO) provenientes do Laboratório The Jackson – USA, foram mantidos no Biotério FCFRP – USP. Após aprovação da CEUA, protocolo n° 007/2017, os camundongos foram transferidos para o Biotério da FOB – USP, onde permaneceram por 7 dias, para adaptação do ambiente, sendo mantidos 3 camundongos por caixa do tipo microisolador e separados em 4 grupos, 129/Sv (WT C) e 5- LO KO (KO C) controles e 129/Sv (WT CAIA) e 5- LO KO (KO CAIA) (artrite induzida).

4.2 Indução e avaliação da artrite reumatoide

O modelo de artrite reumatoide em camundongos, tradicionalmente utilizado, CIA (artrite induzida por colágeno) requer ao menos de 6 a 8 semanas para alcançar o estudo típico. Visando uma redução nesse período, o próprio fabricante desenvolveu um modelo de artrite mais rápida por meio do uso de um coquetel contendo a mistura de 5 anticorpos monoclonais, A2-10 (IgG2a); F10-21 (IgG2a); D8-6 (IgG2a); D1-2G (IgG2b) e D2-112 (IgG2b), contra o colágeno tipo II, possibilitando o desenvolvimento da doença em poucos dias. Adicionalmente, a aplicação de LPS (lipopolissacarídeos – *Escherichia coli (E. coli)* possibilita uma artrite consistente e severa, uma vez que se combina dose sub-artritogênica de coquetel de anticorpos monoclonais e LPS. Deste modo, o modelo baseia-se na hipótese de que toxinas bacterianas, como o LPS, absorvidas através do trato gastrointestinal, desempenha um papel sinérgico e patológico com níveis sub-artritogênicos de anticorpos de colágeno tipo II, desencadeando a AR[61].

Camundongos fêmeas da linhagem 129/Sv e 5-LO KO foram imunizadas intradermicamente via veia caudal no dia considerado zero (dia 0) com 150µL de solução tampão fosfato (PBS) para o grupo controle (C) e 150µL do coquetel indutor da artrite (1,5mg), (Chondrex Inc., Redmond, WA, USA) para o grupo com artrite induzida por anticorpos de colágeno (CAIA). No terceiro dia após a imunização, dia 3, os animais de ambos os grupos, receberam via intraperitoneal, 20µL de PBS e 20µL de LPS, respectivamente. Esse procedimento se repetiu no dia 11, com injeção intraperitoneal de 60µL de PBS e 60µL de LPS, respectivamente[61]. Diariamente o edema das patas (coxim plantar) era mensurado com o auxílio de um paquímetro e no dia 14, os animais foram eutanasiados, as amostras foram coletadas (patas anteriores e posteriores) (**Figura 4**), congeladas para o ensaio molecular (proteoma) e parte permaneceram em solução de formalina (HT501128 – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) para os demais ensaios de coloração e imunomarcações.

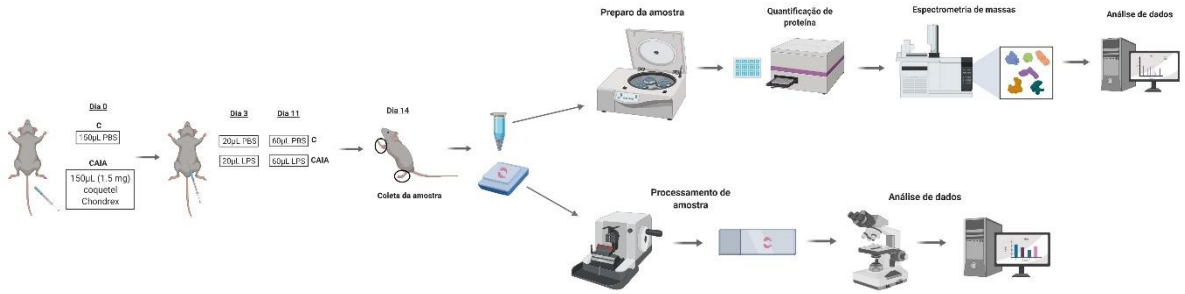


Figura 4. Esquema demonstrativo da indução ou não da artrite nos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO). Inicialmente foi realizado a aplicação do coquetel indutor da artrite – *Chondrex*, via veia caudal (grupo CAIA) ou PBS (grupo controle), no dia 0. No dia 3, os mesmos receberam um reforço intraperitoneal de LPS ou PBS, repetindo-se no dia 11, conforme instruções do fabricante. Diariamente, as patas anteriores e posteriores foram mensuradas com paquímetro. E no dia 14, os animais foram eutanasiados e as amostras coletadas para os ensaios. Parte da amostra foi destinado ao proteoma e outra parte, para os ensaios de coloração e imunomarcação.

Para determinar o grau inflamatório e consequentemente a sinovite, a classificação adotada foi o *score* histopatológico da sinovite, de acordo com Krenn e colaboradores[62] (**Tabela 1**).

Tabela 1. *Score* histopatológico da sinovite segundo Krenn et al (2002)[62], com parâmetros de graduação, 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (intenso/forte). Os valores de todos os parâmetros são contabilizados e adicionados, variando de 0 a 9. 0 – 1: sem sinovite, grau inflamatório (GI) = 0; 2 – 3: ligeira sinovite, GI = 1; 4 – 6: sinovite moderada, GI = 2 e 7 – 9: sinovite forte, IG = 3.

	Hiperplasia / aumento da camada de células no revestimento sinovial	**Infiltrado inflamatório**	**Ativação do estroma sinovial / formação de pannus**
0	**Ausente**	**Ausente**	**Ausente**
1	**Ligeiro aumento** (duas a três camadas de células), células gigantes são muito raras	**Leve infiltrado inflamatório** (células aisladas difusamente localizadas e pequenos agregados de linfócitos e / ou células plasmáticas perivasculares)	**Ligeira ativação do estroma sinovial** (baixa celularidade com leve edema, leve fibrose com alguns fibroblasto, sem células gigantes)
2	**Aumento moderado** (quatro a cinco camadas de células), algumas células gigantes ou linfócitos	**Infiltrado inflamatória moderado** (agregados de linfócitos perivasculares e / ou superficiais, podem ser observados folículos linfáticos de pequeno tamanho sem centro germinativo)	**Ativação moderada do estroma sinovial** (celularidade moderada com densidade moderada de fibroblastos, células endoteliais, células gigantes podem ser detectados)
3	**Aumento forte** (mais de seis camadas de células), células gigantes, linfócitos são frequentes	**Infiltrado inflamatório intenso** (folículos linfáticos com centro germinativo e / ou confluente infiltrado linfocitário subsinovial)	**Forte ativação do estroma sinovial** (alta celularidade com distribuição densa de fibroblastos e células endoteliais, as células gigantes são abundantes)

4.3 Processamento das amostras e preparo das lâminas – HE, TM, IHQ e IF

Para os ensaios de coloração e imunomarcação, foram utilizados 3 camundongos por grupo (n=3). As amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada (HT501128 – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 48 horas, seguido de lavagens em H_2O deionizada e submetidas ao processo de descalcificação em solução à 4,13% de EDTA (108418 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany e 0,44% de NaOH (S5881 – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), à 2°C – 8°C por aproximadamente vinte e um dias, com trocas semanais da solução descalcificadora.

Após o período determinado, as amostras foram lavadas em H_2O deionizada e submetidas a inclusão em parafina Histosec® (parafina + resina) (111609 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Os cortes foram feitos em micrótomo Leica, com espessura 4 a 5µm em lâminas silanizadas para a técnica de Imuno-histoquímica e Imunofluorescência, e para colorações de Hematoxilina/Eosina e Tricrômico de Masson, respectivamente.

4.4 Imuno-histoquímica

As lâminas foram acondicionadas em estufa à 60°C, *overnight* para remoção do excesso de parafina. No dia seguinte, as mesmas foram imersas em xilol (X1001.01.BJ – LabSynth, Diadema – SP, Brasil) por 5 minutos, seguido de dois banhos em álcool absoluto (1.00983 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 5 minutos, álcool 70% e água destilada, por 5 e 3 minutos respectivamente.

Posteriormente, realizou-se a recuperação antigênica por 15 minutos no *Steamer* à 96°C em solução de citrato de sódio, pH 6 (106448 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Após resfriadas, as lâminas foram lavadas 1x com solução TBS (Cloreto de sódio – 106404 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany; e Tris – 1610719 – Bio-Rad Laboratories em H_2O destilada) por 3 minutos.

O corte foi delimitado e iniciou-se o bloqueio de peroxidase endógena (DHP-125 – Spring, Pleasanton, CA, US) por 10 minutos em câmara úmida, protegido da luz. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução TBS por 3 minutos, e então

iniciou-se o bloqueio da proteína sérica (X0909 – Dako North America, Carpinteria, CA, US) por 15 minutos, em câmara úmida protegido da luz.

A solução bloqueadora foi descartada e os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-IL-1β (1:750; ab9722 – Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) e anti-IL-6 (1: 250; ab208113 – Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), em diluente para anticorpo (ADS-125 – Spring, Pleasanton, CA, USA) por 1 hora em câmara úmida em TA. Após o período de incubação, o anticorpo foi removido e os cortes foram lavados com solução TBS por 3 minutos.

Posteriormente, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário Goat anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (1:1000; ab205718 – Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) em BSA 1% (Albumina Bovina – ref. 1870, Inlab, Diadema – SP, Brasil) por 1 hora em câmara úmida à TA. Em seguida, a visualização deu-se por meio do cromógeno DAB (K4065 e K3468 – Dako North America, Carpinteria, CA, USA, respectivamente) por 1 minuto. Os cortes foram lavados em água destilada por 3 minutos e contra corados com hematoxilina de Mayer (S3309 – Dako North America, Carpinteria, CA, USA) por 5 minutos.

Ao final, as lâminas foram imersas em álcool 70% por 3 minutos, seguido de dois banhos em álcool absoluto por 3 minutos, 3 banhos de xilol por 3 minutos e montadas com resina *Entellan* (107961 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

4.4.1 Análise da Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos corados por imuno-histoquímica (IL-1β e IL-6) foram digitalizados em imagens de alta resolução usando o *Scanner* de *slides* Aperio Scanscope CS (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA) em 20X. Adicionalmente, as imagens digitais foram analisadas usando o Aperio Positive Pixel Count (V9, Aperio ImageScope) em regiões anotadas manualmente, correspondente à diartrose das patas anteriores de todos os grupos analisados.

Três regiões em áreas representativas medindo 102.000μm^2 de cada seção dos tecidos associados à diartrose (cápsula articular e cartilagem articular) foram aplicadas em forma de retângulo. Dentro das regiões anotadas, os resultados dos pixels foram classificados automaticamente pelo *software*, considerando a intensidade

como, fraca (f), moderada (m) ou forte (ff). Finalmente, um *score* foi estabelecido calculando a média das três categorias, para cada grupo estudado[63] (Fonseca et al, 2016).

4.5 Imunofluorescência

As lâminas foram acondicionadas em estufa à 60°C, *overnight* para remoção do excesso de parafina. No dia seguinte, as mesmas foram imersas em xilol (X1001.01.BJ – LabSynth, Diadema – SP, Brasil) por 5 minutos, seguido de dois banhos em álcool absoluto (1.00983 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 5 minutos, álcool 70% e água destilada, por 5 e 3 minutos respectivamente.

Posteriormente, realizou-se a recuperação antigênica por 5 minutos no *Steamer* à 96°C em solução de citrato de sódio, pH 6 (106448 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Após resfriadas, as lâminas foram lavadas 1x água destilada por 5 minutos.

Os cortes foram delimitados e permeabilizados por meio de solução à 0,3% Triton X-100 (X100 – Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, MO, USA) em PBS, por 10 minutos, seguido de 3 lavagens com PBS.

Posteriormente, iniciou-se o bloqueio com BSA à 3% por 10 minutos, o mesmo foi descartado e lavado 1x com PBS.

Os cortes foram cuidadosamente secados e adicionado o anticorpo primário anti-CD34 (ab8158 – Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) ou anti-CD31 (AF3628 - R&D Systems Biotechne, Minneapolis, MN, USA) ambos na concentração de 1:150, preparados em BSA 1%, permanecendo por 3h à 4°C, em câmara úmida e protegido da luz. Após o período de incubação, os cortes foram lavados 2x com PBS e conjugados com o anticorpo secundário, goat anti-Rat IgG H&L – Alexa Fluor 546 (A11081 – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e goat anti-Rat IgG H&L – Alexa Fluor 488 (ab150157 – Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), respectivamente, na concentração de 1:300 por 90 minutos, à 4°C, protegido da luz.

Após duas lavagens com PBS, a visualização dos núcleos foi determinada pelo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride) (D1306 – Life Technologies Corporation, Eugene, OR, US) na concentração de 1:300 por 5 minutos em TA.

Os cortes foram lavados cuidadosamente com PBS e selados com meio de montagem *Fluoromount-G* (00-4958-02 – Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, US) e acondicionados à -20°C, protegidos da luz para posterior microscopia confocal de fluorescência.

4.5.1 Análise da Imunofluorescência

A partir dos cortes histológicos corados pela técnica da imunofluorescência foram obtidas quatro imagens de alta resolução para cada um dos espécimes correspondentes a cada grupo de estudo empregando Microscopia confocal (Leica TCS SPE Confocal Laser Scanning Microscope, Mannheim, BW, Germany) à 40x. As imagens digitais adquiridas foram analisadas através do programa *ImageJ – Fiji* (National Institutes of Health, NIH, USA). Obteve-se assim um valor de intensidade de fluorescência correspondente a cada uma das fatias (*slides*) que constituem uma imagem de microscopia confocal. Dentre todas as fatias (*slides*) geradas pela microscopia confocal, foi considerado o valor correspondente ao maior pico de intensidade de fluorescência. Em seguida, foi realizada uma média das quatro imagens de cada amostra para determinar a intensidade de fluorescência correspondente a cada grupo estudado.

4.6 Espectrometria de massas

4.6.1 Preparo das amostras

Para o ensaio proteômica, a cada 2 animais (*pool*) foram processadas as patas anteriores e posteriores, somando n=3, ou seja, triplicata biológica, totalizando 6 animais por grupo experimental.

Etapa 1 – Inicialmente, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, inseridas em microtubos. Para a extração das proteínas, foi adicionado uma solução

de extração contendo 7M de Uréia (17131901 – GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), 2M de Thiourea (T7875 – Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, MO, USA), 40mM DTT (*Dithiothreitol* – 161-0611 – Bio-Rad Laboratories, Inc, Canada) em 50 mM de Ambic (*Ammonium bicarbonate* – A6141 - Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, MO, USA), permanecendo por 10 minutos em vórtex à 4ºC, seguido de ultrassom por 5 minutos e centrifugação à 20,817*x*g à 4º C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e repetiu-se esse procedimento por mais 2x.

Etapa 2 – A partir do sobrenadante coletado, as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (500-0205 e BSA – 500-0206 – BioRad, Hercules, CA, USA) e uma parte e meia de 50mM de Ambic foi adicionado nas amostras, seguido de *Rapigest SF* 0,2% (186001861 – Waters Co, Milford, MA, USA), vórtex e incubação por 60 minutos à 37º C. As amostras foram reduzidas com a adição de 5mM de DTT, permanecendo à 37ºC por 40 minutos seguidas de spin por 2 minutos e alquiladas com 10mM de IAA (iodoacetamida – RPN6302 - GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) por 30 minutos em TA, protegido da luz.

As amostras foram digeridas com tripsina à 2% (90057 – Thermo Scientific, Rockford, IL, US) por 14h à 37ºC, seguido de bloqueio com TFA 5% (ácido trifluoracético – 91707 – Sigma-Aldrich Chemio GmbH, Steinheim, Switzerland) à 37ºC, por 90 minutos e centrifugação à 20,87 xg à 6º C, por 30 minutos.

Etapa 3 – Em seguida, as amostras foram purificadas e dessalinizadas utilizando colunas C18 Spin - *Peptide Cleanup C18 Spin* (5188-2750 – Agilent Technologies, West Cedar Creek, Texas, USA), conforme instruções do fabricante, e após o processo de purificação e dessalinização, os peptídeos foram dosados pelo método de Bradford. Foram retirados 50 µg/proteínas e adicionados em microtubos para a realização da análise quantitativa. As amostras foram secas em *Speed Vac* (Eppendorf, Hamburgo, DE) e congeladas à -20°C até o processamento no espectrômetro de massas.

Etapa 4 – As amostras foram descongeladas e ressuspensas em acetonitrila 3% (100029 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e Ácido Fórmico 0,1% (33015 – Sigma-Aldrich Co LLC, St. Louis, MO, USA) e adicionadas em *Total Recovery Vial* (186000384c – Waters Technologies). Para a análise dos peptídeos foi utilizado o

espectrômetro de massas Xevo G2 (Waters Technologies) acoplado ao sistema *nanoACQUITY* (Waters, Manchester, Reino Unido).

4.6.2 Aquisição nano LC-ESI-MS/MS

Os peptídeos foram analisados por meio do espectrômetro de massas Xevo G2 (Waters Technologies) acoplado ao sistema *nanoACQUITY* (Waters, Manchester, Reino Unido), sendo as amostras realizadas em triplicata. O UPLC *nanoACQUITY* (Waters Corporation) é equipado com uma coluna analítica de fase reversa *nanoACQUITY HSS T3* (75 µM X 150mm, tamanho de partícula de 1,8µom, Waters). A coluna foi equilibrada com a fase móvel A (ácido fórmico 0,1% em água). Os peptídeos foram separados com um gradiente linear de 7-85% da fase móvel B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) por 70 min., a um fluxo de 0.35 µL/min. A temperatura da coluna foi mantida em 55ºC. O espectrômetro de massas Xevo G2 Q-TOF foi operado no modo iônico positivo *nanoeletrospray* e os dados foram coletados usando o método MSE em energia elevada (19-45 V), que permite a aquisição dos dados tanto dos íons precursores quanto fragmentos, numa única injeção. As condições de fonte incluíram: voltagem do capilar, 2.5kV; cone de amostras, 30V; Cone de extração, 5V; e temperatura da fonte, 80ºC. A aquisição dos dados ocorreu durante 70 min. e a variação da varredura foi de 50-2000 Da. O *lockspray*, usado para assegurar acurácia e reprodutibilidade, foi operado com uma solução de [Glu1] fibrinopeptídeo (1pmol/µL) a um fluxo de 1µL/min., com íon de referência no modo positivo a m/z 785.8427. O *software Protein Lynx Global Server* (PLGS) versão 3.0 foi utilizado para processar e pesquisar os dados *LC-MSE contínuos*. As proteínas foram identificadas utilizando o algoritmo de contagem de íons do *software*, sendo realizada pesquisa na base de dados *mus musculus* (revisado apenas, *UniProtKB*/*Swiss-Prot*) baixado em janeiro de 2021 do UniProtKB (http: //www.uniprot .org).

4.6.3 Quantificação livre de marcadores

A análise quantitativa livre de marcadores foi realizada utilizando o *software Protein Lynx Global Service* (*PLGS*, v 3.0, Waters, Co, Manchester, UK). Todas as proteínas identificadas que apresentassem um *score* com confiança maior que 95% foram inclusas na análise quantitativa. Os peptídeos idênticos de cada triplicata por

amostra foram agrupados com base na precisão de massa (<10 ppm) e numa tolerância de tempo de retenção <0,25 minutos, usando o *software* de agrupamento incluso no *PLGS*. A diferença de expressão entre os grupos foi analisada pelo teste *t* (p <0,05) e expressas como p<0,05 para as proteínas subreguladas e 1-p>0,95 para as proteínas superreguladas, respectivamente. As seguintes comparações relevantes foram realizadas: WT CAIA vs WT C, KO CAIA vs KO C, KO CAIA x WT CAIA, KO C vs WT C.

4.6.4 Análise de Bioinformática

A ontologia genética foi avaliada de acordo com os *pluggins ClueGo*® do software *Cytoscape*® *3.8.2.* Foi feita a distribuição funcional das proteínas identificadas com expressão diferencial nas diferentes comparações. As categorias de proteínas foram baseadas na anotação *Gene Ontology (GO)* do amplo Processo do Sistema Imune. Os termos de significância (Kappa = 0,04) e distribuição foram de acordo com a porcentagem do número de genes associados. O número de acesso das proteínas foi fornecido pela *UNIPROT.*

4.7 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de imunomarcação, foram analisados no programa GraphPad Prisma (San Diego, CA, USA). Os grupos foram submetidos a análise de variância ANOVA Oneway, complementado pelo teste de *Tukey*, quando apropriado, com nível de significância de p<0,05.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Inicialmente, todos os animais foram pesados para posteriormente receberem ou não o coquetel indutor da artrite. Esse mesmo procedimento foi repetido no dia da eutanásia e de acordo com a **Figura 5 (A-D)**, podemos verificar uma homogeneidade entre os camundongos e ao final do período experimental, os mesmos não apresentaram alteração no peso.

- **Pesagem**

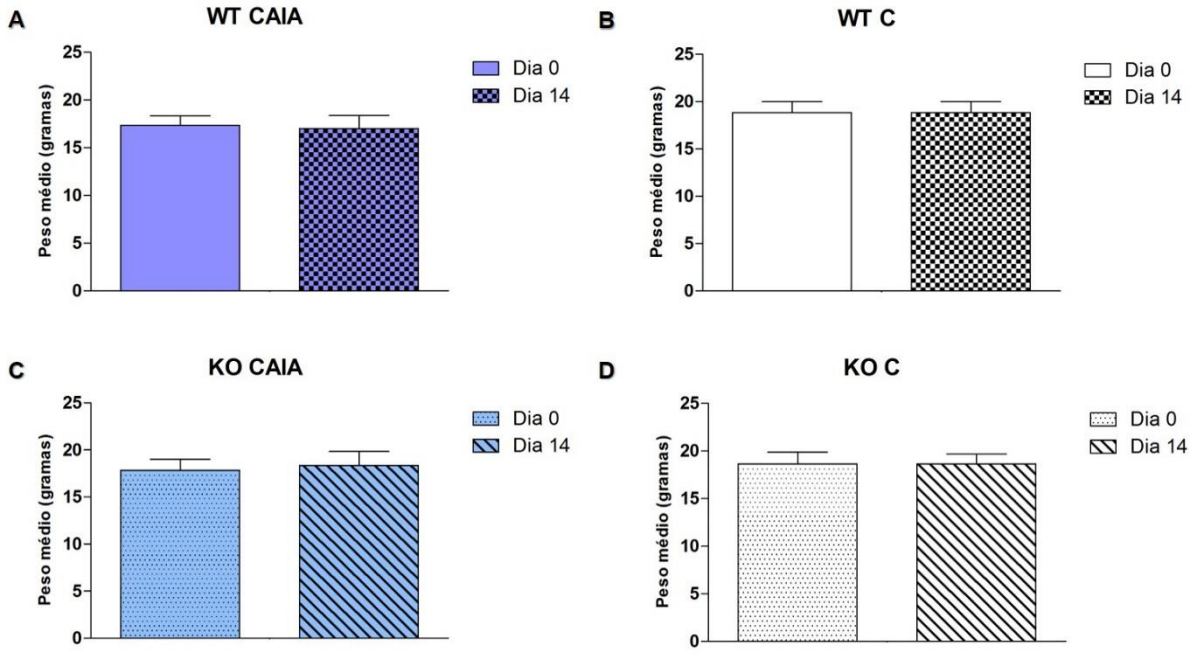


Figura 5. Peso médio em gramas dos grupos, WT CAIA (A), WT C (B), KO CAIA (C) e KO C (D) respectivamente, correspondente ao dia 0 (coquetel Chondrex – indutor da artrite para os grupos CAIA e solução PBS para os grupos controles) e dia 14 (eutanásia). Não houve diferença significativa entre os grupos.

- **Sinais Clínicos**

Os sinais clínicos como edema e eritema foram avaliados diariamente nas patas anteriores e posteriores dos camundongos. Nas figuras **6A, 6C, 7A e 7C**, podemos verificar a evolução do edema com o passar dos dias, totalizando 14 dias, segundo instruções do fabricante *Chondrex*.

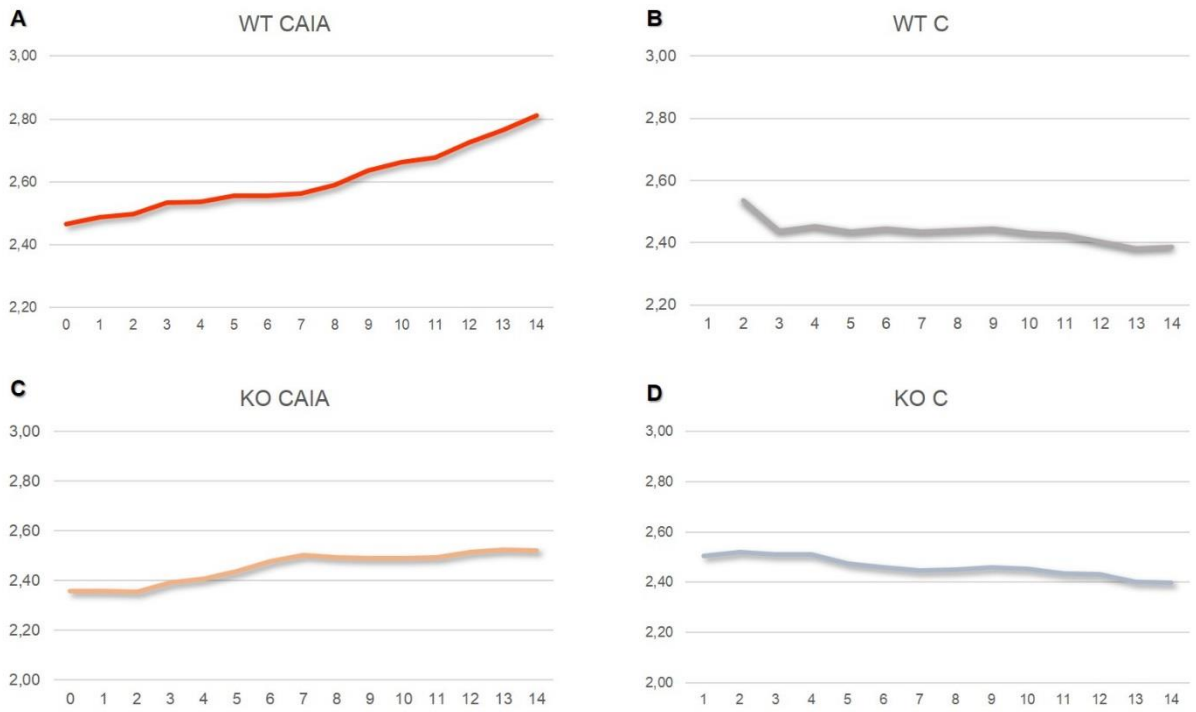


Figura 6. Avaliação clínica da atividade da artrite nas patas anteriores dos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO), CAIA e controles. O edema foi mensurado diariamente por meio de paquímetro e os resultados estão expressos em mm, até o período de 14 dias.

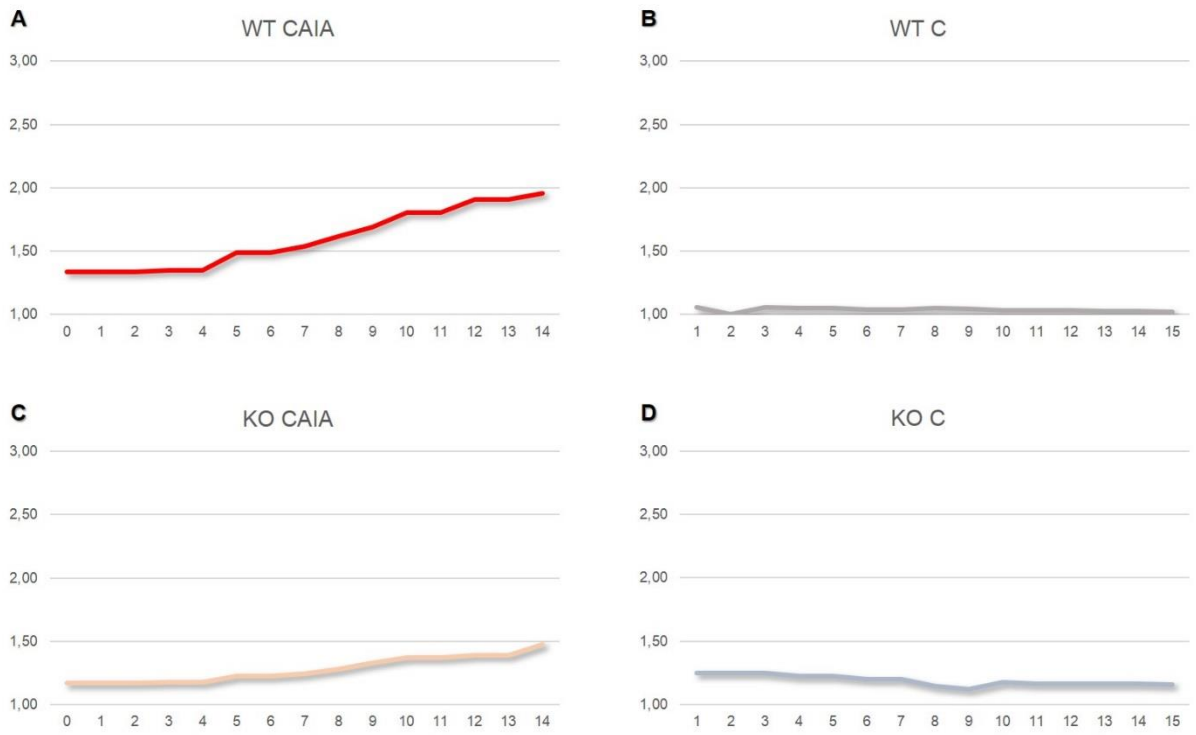


Figura 7. Avaliação clínica da atividade da artrite nas patas posteriores dos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO), CAIA e controles. O edema foi mensurado diariamente por meio de paquímetro e os resultados estão expressos em mm, até o período de 14 dias.

Clinicamente foi possível observar que apenas os camundongos WT CAIA apresentaram os sinais macroscópicos da artrite reumatoide, especialmente em seu período máximo (data da eutanásia). Entre os sinais evidentes, destacam-se eritema e edema mais pronunciadas nas patas anteriores e posteriores (**Figura 8**). Já em relação a análise microscópica, a inflamação foi observada apenas no grupo WT CAIA. Em relação ao grupo KO CAIA, verificamos um eritema, mais sutil. Os grupos controles que não receberam o coquetel CAIA não apresentaram sinais de edema ou eritema durante o período experimental.

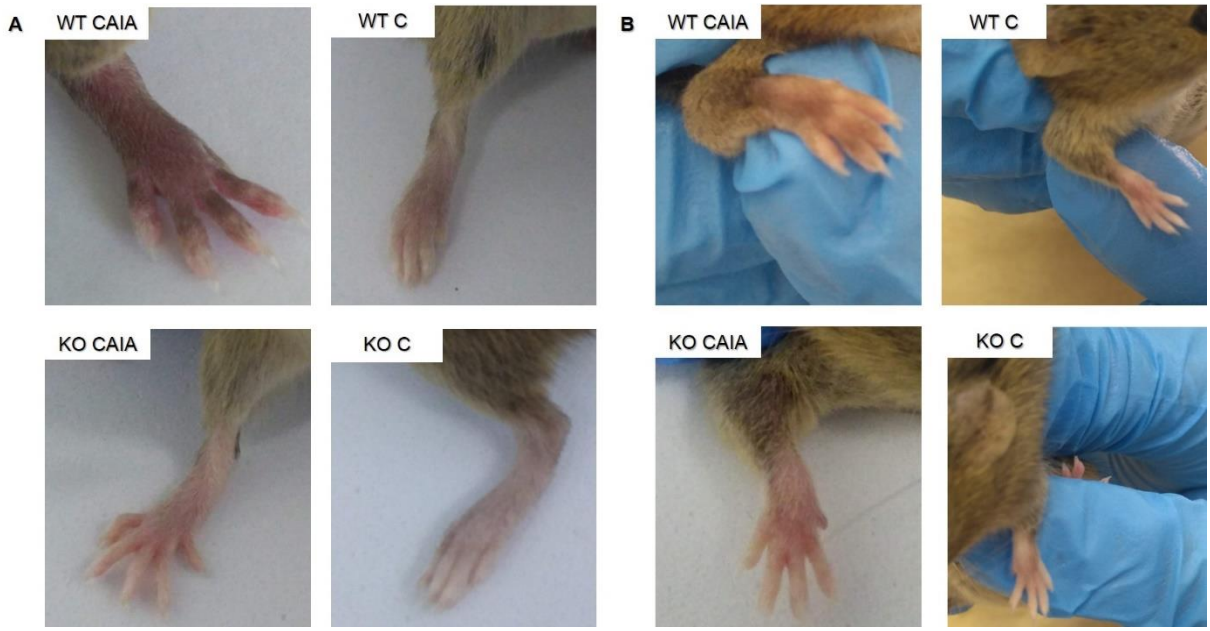


Figura 8. Sinais clínicos da atividade da artrite nas patas posteriores (A) e anteriores (B) dos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO KO (KO). Podemos verificar edema e eritema acentuados nas patas posteriores e anteriores dos animais WT CAIA, diferentemente do grupo KO CAIA.

A **tabela 2**, demonstra de forma qualitativa, a severidade do processo inflamatório, segundo o fabricante. De acordo com o acompanhamento diário do desenvolvimento da doença, e tendo em vista os resultados obtidos dos ensaios de coloração, classificamos o grupo WT CAIA num score entre 2 – 3, e o grupo KO CAIA, no score 0 – 1, uma vez que o fabricante não fornece imagens como parâmetro de comparação. Em adição, os grupos controles WT C e KO C, nos quais receberam apenas a administração do veículo, obtiveram o score 0 durante todo o período experimental.

Tabela 2. Tabela demonstrativa do escore qualitativo adotado para avaliar a severidade do inchaço das patas, segundo o fabricante Chondrex, Inc.

Score	Condição
0	Normal
1	Vermelhidão e inchaço leve, mas definida do tornozelo ou punho, ou vermelhidão aparente e inchaço limitado aos dedos individuais, independentemente do número de dedos afetados
2	Vermelhidão moderada e inchaço do tornozelo ou punho
3	Vermelhidão intensa e inchaço em toda a pata, incluindo os dedos
4	Membro com inflamação máxima envolvendo múltiplas articulações

A partir dos resultados obtidos, conforme demonstrado na **Figura 9**, classificamos os grupos segundo o *score* histopatológico de Krenn et al 2002[62], descrito na metodologia (**Tabela 1**), em grupos sem sinovite e sinovite moderada (**Figura 10**).

Resultados da microscopia óptica mostraram que os camundongos do grupo WT C não apresentaram quaisquer alterações na região da cartilagem articular, bem como, nas regiões adjacentes, incluindo periósteo, membrana sinovial e cápsula fibrosa. Por outro lado, a análise microscópica do grupo WT CAIA evidenciou sinais compatíveis com sinovite moderada (Grau inflamatório 2), incluindo hiperplasia da membrana sinovial, infiltrado inflamatório de leve à moderado e formação de *pannus* na região articular. Concomitantemente, na coloração por Tricrômico de Masson, pôde-se observar baixa intensidade das fibras de colágeno nas áreas inflamadas (**Figuras 9** e **10**).

Em relação aos grupos 5-LO KO, foi possível observar que no grupo KO C, as regiões articulares das patas anteriores mantiveram-se como nos animais WT do mesmo grupo, com ausência de alterações na cartilagem articular e regiões adjacentes. Curiosamente, nos animais KO CAIA, onde houve a indução da artrite, a mesma não se desenvolveu com sinais evidentes; no qual preservou-se a membrana sinovial e os tecidos cartilaginosos, ósseo e conjuntivo propriamente dito (**Figuras 9** e **10**), sugerindo a relação dos LTs no estabelecimento da AR.

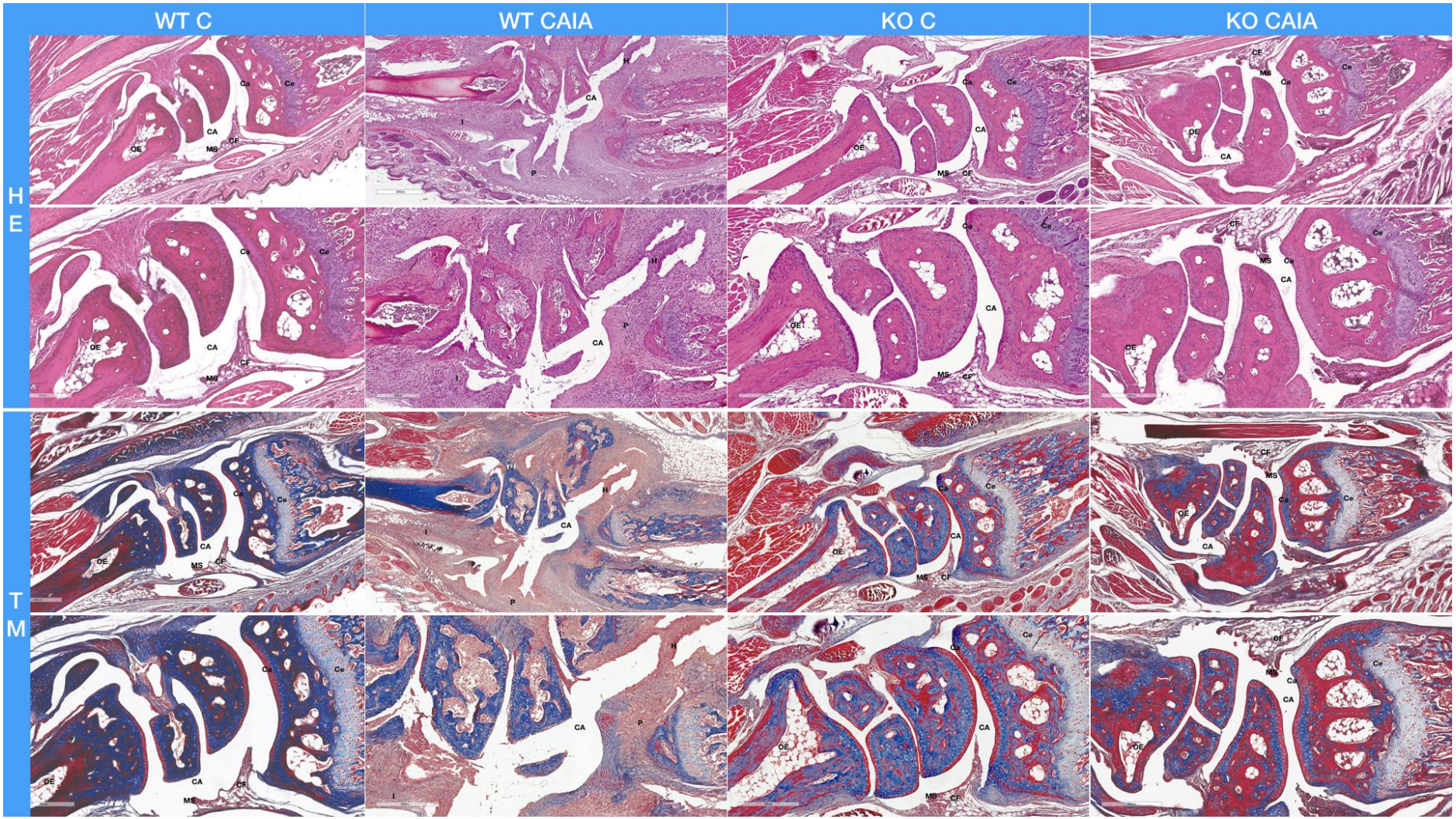
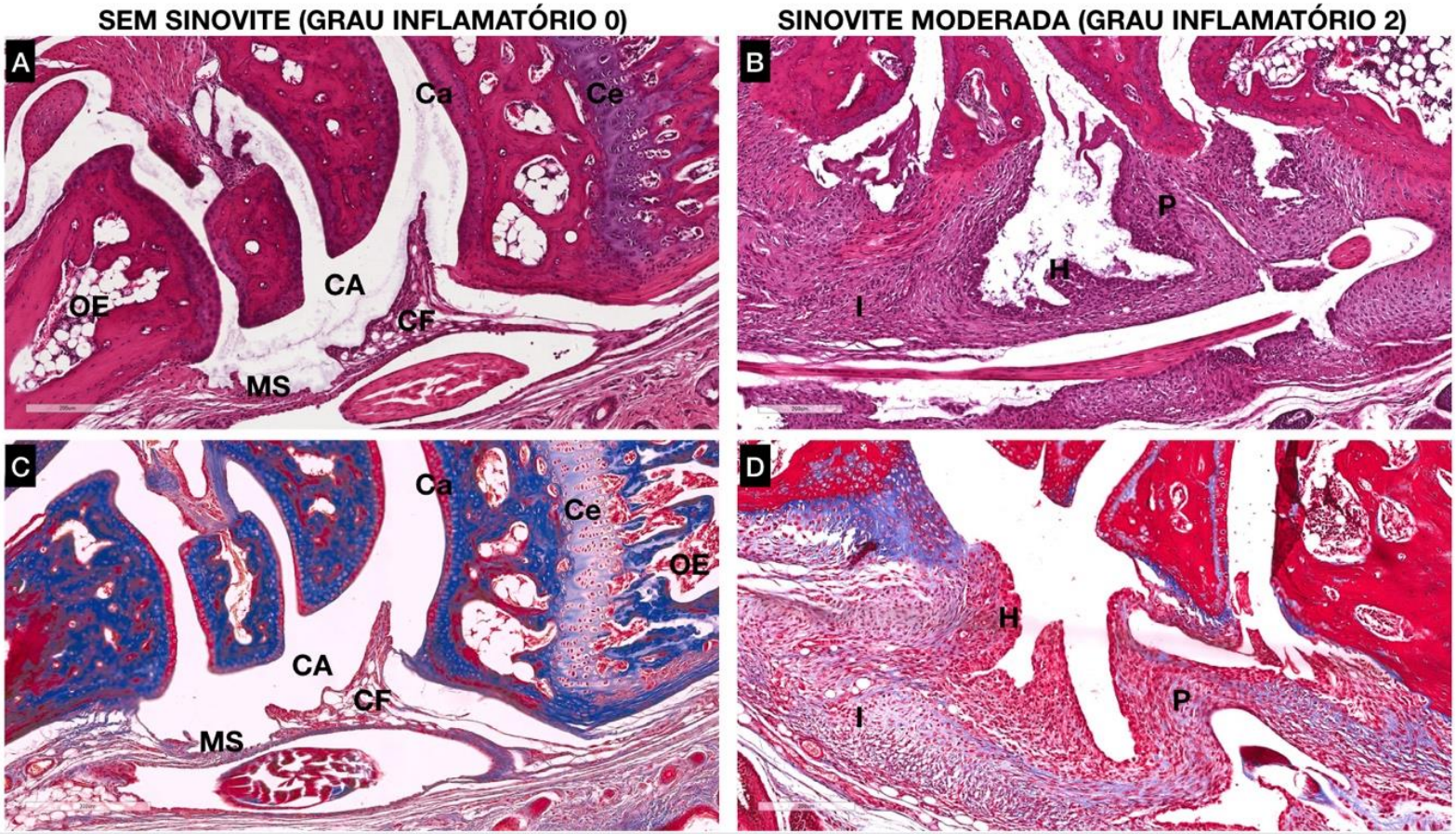


Figura 9. Características histopatológicas representativas em cada um dos grupos de estudo (WT C, WT CAIA, KO C e KO CAIA), correspondentes a coloração de Hematoxilina e Eosina (**HE**) e Tricrômico de Masson (**TM**). CA: cavidade articular; CF: cápsula fibrosa; MS: membrana sinovial; OE: osso esponjoso; Ca: cartilagem articular; Ce: cartilagem epifisária. H: hiperplasia de membrana sinovial; I: infiltrado inflamatório; P: *Pannus*.



WT CONTROL	X	
WT CAIA		X
KO CONTROL	X	
KO CAIA	X	

Figura 10. Características histopatológicas no score de sinovite. Em **A** (Hematoxilina e Eosina) e **C** (Tricrômico de Masson): Imagens representativas da articulação das patas dianteiras, dos grupos WT C, KO C e KO CAIA; sem sinovite (GI=0). CA: cavidade articular; CF: cápsula fibrosa; MS: membrana sinovial; OE: osso esponjoso; Ca: cartilagem articular; Ce: cartilagem epifisária. Em **B** (HE) e **D** (TM): Imagens representativas dos achados encontrados no grupo WT CAIA; sinovite moderada (GI=2). H: hiperplasia de membrana sinovial; I: infiltrado inflamatório; P: *Pannus*.

Em relação a imunoexpressão, para investigar a presença de mediadores inflamatórios nas articulações e nos tecidos adjacentes na artrite induzida, avaliamos a expressão de IL-1β e IL-6 nos animais WT C, WT CAIA, KO C e KO CAIA (**Figuras 11, 12**). A imunoexpressão da IL-1β foi preferencialmente nuclear nos condrócitos articulares, e focalmente citoplasmática nas células da membrana sinovial nos grupos WT C (**Figura 11A**). Por outro lado, nos grupos WT CAIA, onde houve a indução da artrite, as células hiperplásicas da membrana sinovial apresentaram imunomarcação preferencialmente citoplasmática, já as células inflamatórias apresentaram marcação nuclear focal (**Figura 11B**).

Em relação aos grupos 5-LO KO, o grupo KO C, controle sem a indução da artrite, apresentou a expressão de IL-1β nos condrócitos articulares de maneira focal, concentrando-se na região nuclear **(Figura 11C**). Similarmente ao grupo no qual houve a manifestação da artrite reumatoide (WT CAIA), as células da membrana sinovial apresentaram baixa imunomarcação citoplasmática, enquanto os condrócitos mantiveram a marcação nuclear nos grupos KO CAIA (**Figura 11D**). Ressaltamos que a marcação difusa no tecido conjuntivo próximo a região articular não desempenhou grande impacto nas análises histomorfométricas.

Ao quantificarmos a expressão das interleucinas IL-1β e IL-6, a imunoexpressão da IL-6 nos diferentes grupos, notamos um padrão semelhante ao encontrado na imunoexpressão da IL-1β, porém, sem diferença significativa, diferentemente da IL-1β (**Figura 13**). Nos grupos WT C, a imunoexpressão de IL-6 foi restrita ao núcleo dos condrócitos (**Figura 12A**); já nos grupos WT CAIA a imunomarcação foi encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma dos condrócitos, sinoviócitos, e células inflamatórias locais (**Figura 12B**). Nos animais KO, a presença de IL-6 foi focal, concentrando-se principalmente nos condrócitos e nos sinoviócitos, tanto nos grupos KO C (**Figura12C**) e KO CAIA (**Figura 12D**).

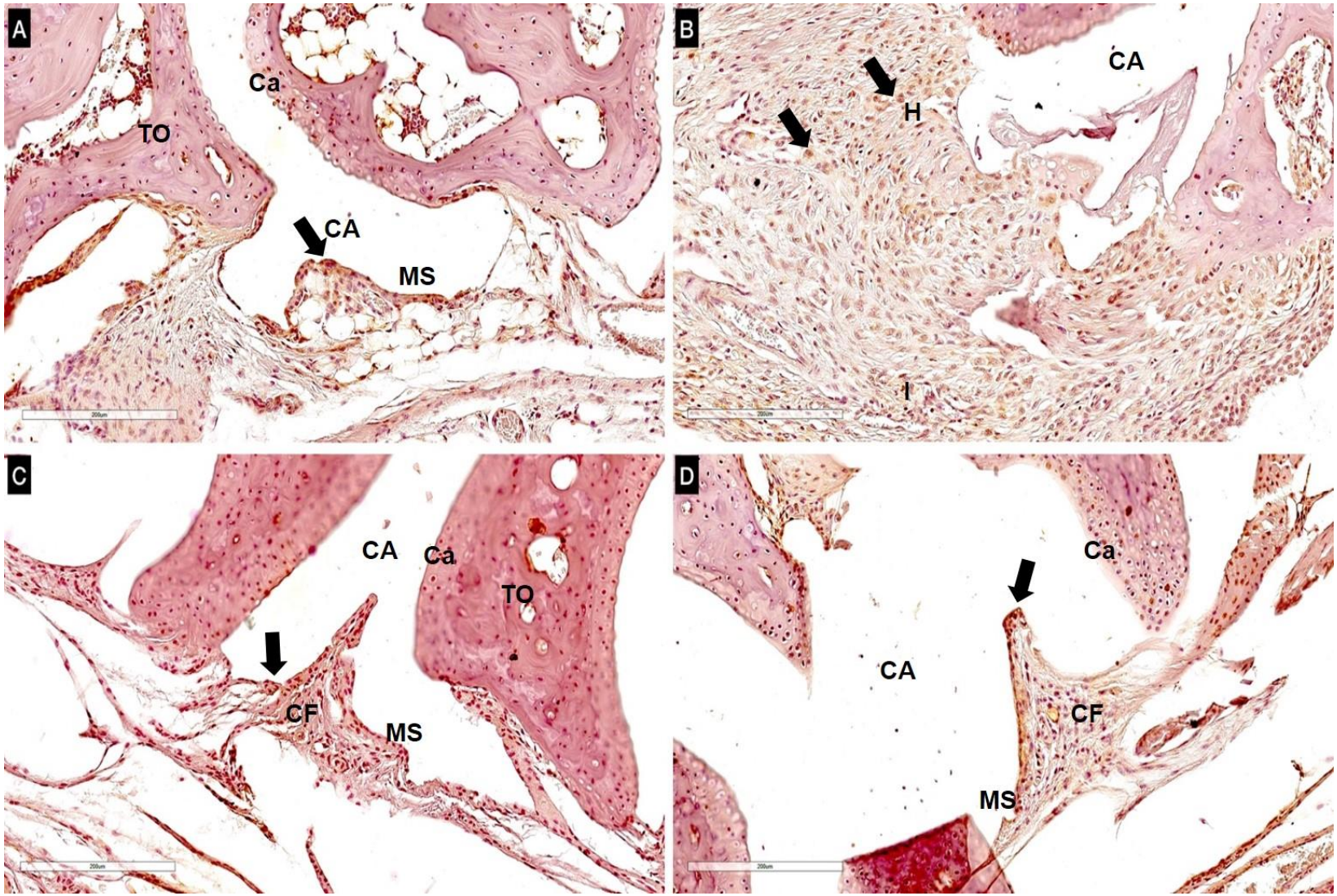


Figura 11. Cortes histológicos de tecido sinovial com imunomarcação de IL-1β (setas), contracoloração com hematoxilina. (**A**) grupo WT C; (**B**) grupo WT CAIA; (**C**) grupo KO C; e (**D**) grupo KO CAIA. CA: cavidade articular; MS: membrana sinovial; Ca: cartilagem articular; TO: tecido ósseo; CF: cápsula fibrosa; H: hiperplasia da membrana sinovial; I: infiltrado inflamatório. Setas indicam a expressão da citocina.

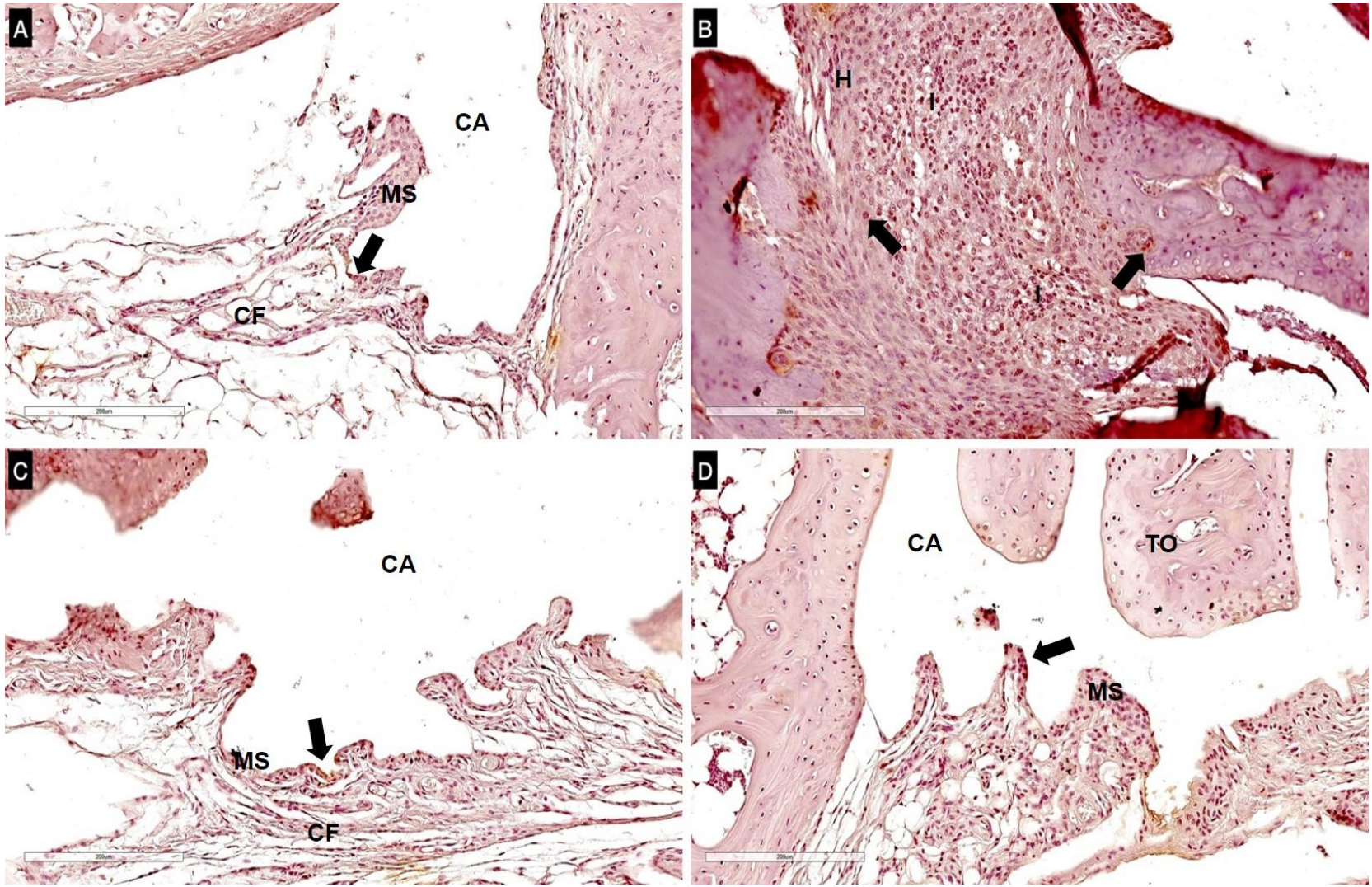


Figura 12. Cortes histológicos de tecido sinovial com imunomarcação de IL-6 (setas), contracoloração com hematoxilina. (**A**) grupo WT C; (**B**) grupo WT CAIA; (**C**) grupo KO C; e (**D**) grupo KO CAIA. CA: cavidade articular; MS: membrana sinovial; Ca: cartilagem articular; TO: tecido ósseo; CF: cápsula fibrosa; H: hiperplasia da membrana sinovial; I: infiltrado inflamatório. Setas indicam a expressão da citocina.

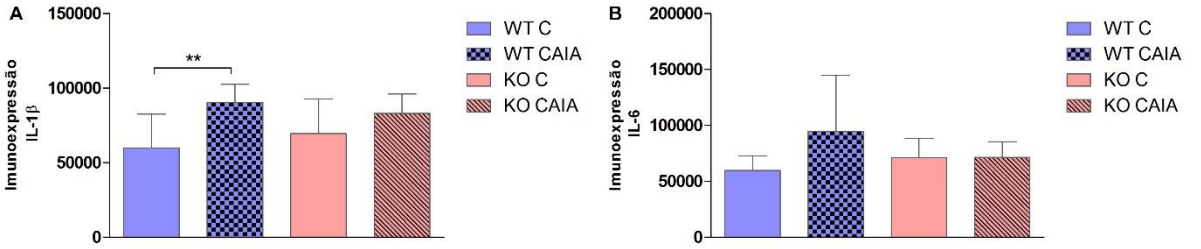


Figura 13. Quantificação da imunoexpressão de interleucinas, IL-1β (A) e IL-6 (B) entre os grupos controles WT C e KO C, e experimentais WT CAIA e KO CAIA. *One-way ANOVA* seguido de *Tukey* (means ± SD). GraphPad Prisma 5. ** p<0.005. Softawre Aperio Positive Pixel Count (V9, Aperio ImageScope).

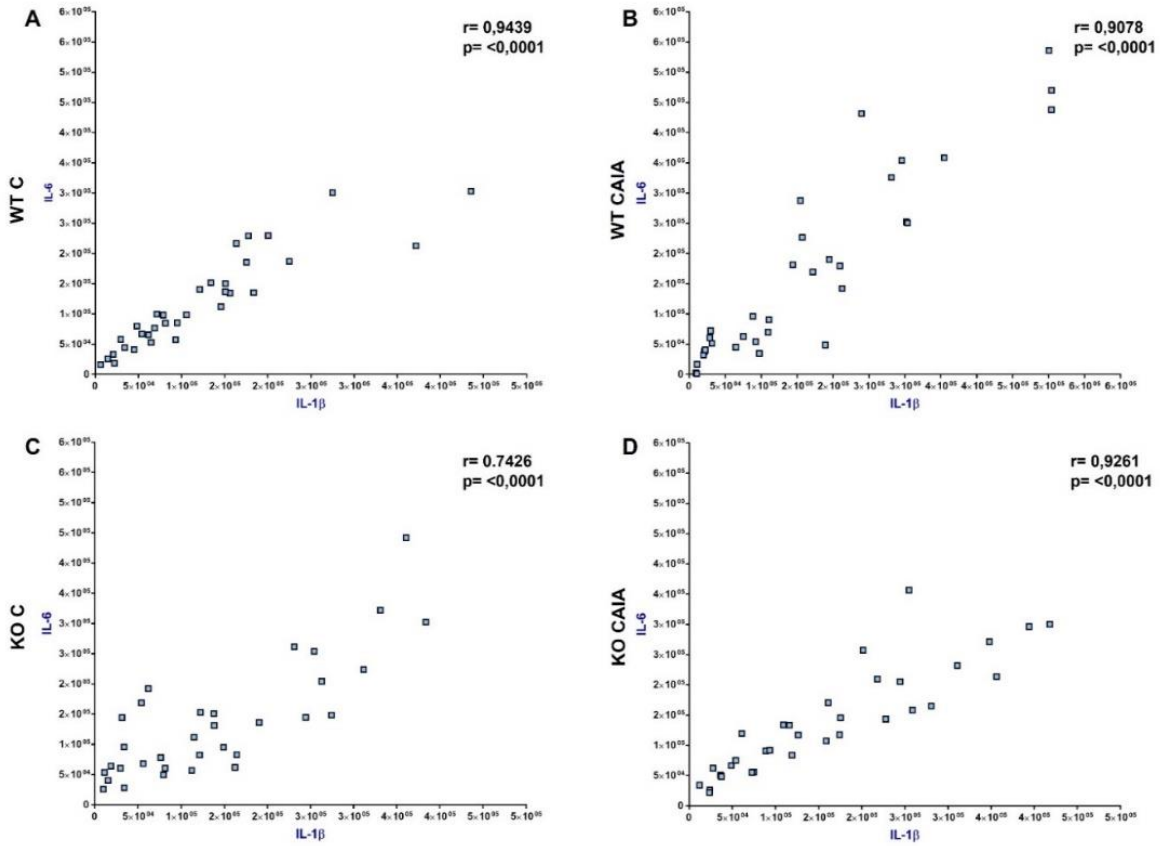


Figura 14. Correlação positiva entre as interleucinas IL-1β e IL-6 nos grupos WT C (A), WT CAIA (B), KO C (C) e KO CAIA (D). Nos grupos WT C e KO CAIA foi possível observar que a imunoexpressão das citocinas foi homogênea entre os animais, no entanto esse padrão não se manteve nos animais WT CAIA e KO C. Coeficiente de correlação de *Spearman*, GraphPad Prisma 7.

Adicionalmente, foi realizado uma análise de coeficiente de correlação de *Spearman* entre as interleucinas estudadas. Uma correlação positiva foi encontrada entre as interleucinas IL-1β e IL-6 estatisticamente significativa para todos os grupos ($p<0,0001$); destacando uma homogeneidade entre os animais para imunoexpressão das citocinas, nos grupos WT C e KO CAIA, diferentemente nos grupos WT CAIA e KO C (**Figura 14A-D**). Essa análise nos permite afirmar, portanto, que existe uma correspondência entre os dois marcadores.

É de conhecimento que a detecção de vasos sanguíneos por meio da avaliação dos anticorpos CD34 e CD31 em células endoteliais, facilitam a predição da vascularização na presença da artrite reumatoide[(64)]. Para tanto, avaliamos ambos marcadores nos diferentes grupos, WT C, WT CAIA, KO C e KO CAIA.

Em relação a imunorreatividade, os grupos WT C e WT CAIA, a imunorreatividade do CD34 foi especialmente expressa em células endoteliais isoladas presentes na região adjacente à membrana sinovial (Figura 15A) e permeando o infiltrado inflamatório articular (Figura 15B), respectivamente. Complementarmente, a imunorreatividade do CD31 restringiu-se aos pequenos vasos localizados abaixo da membrana sinovial de ambos os grupos (**Figura 15C-D**).

Por outro lado, nos animais KO C e KO CAIA, a imunorreatividade do CD34 concentrou-se preferencialmente na região citoplasmática das células endoteliais, seguida pela imunomarcação em pequenos capilares e células inflamatórias dispersas no tecido (**Figura 15E-F**, respectivamente). Adicionalmente, ao avaliarmos a imunomarcação do CD31 notamos uma leve intensidade nos grupos KO CAIA e WT CAIA comparados ao WT C, no qual o grupo KO C exibiu baixa intensidade de imunomarcação nos vasos do tecido conjuntivo abaixo da membrana sinovial (**Figura 15G**). Por fim, o grupo KO CAIA apresentou uma leve intensidade na imunomarcação dos vasos sanguíneos próximos a região articular, no qual podem ser focalmente observados condrócitos positivos na região citoplasmática para este marcador (**Figura 15H**).

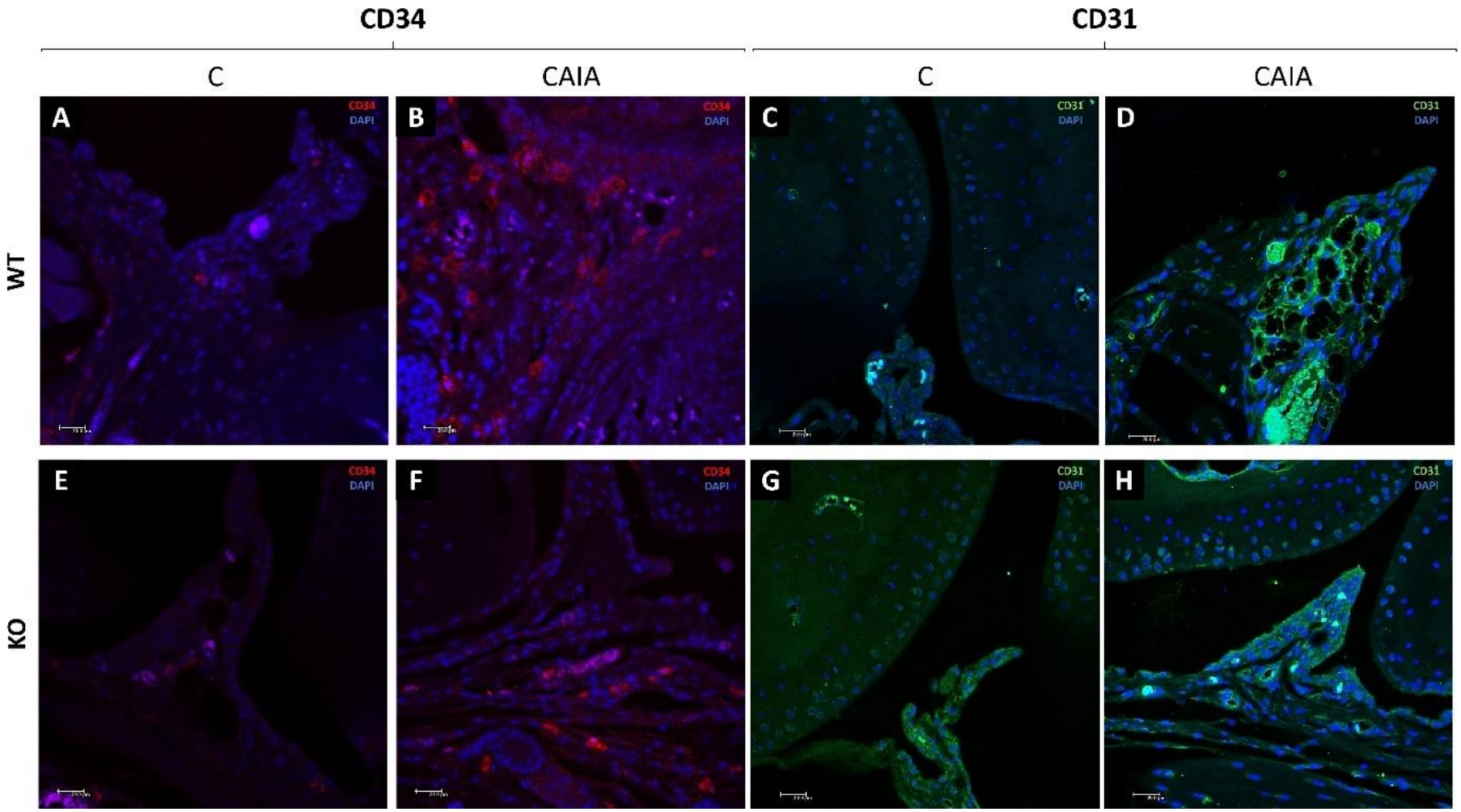


Figura 15. Fotomicrografias representativas de microscopia fluorescência de seções de tecido sinovial. (**C e G-H; A, E-F)** Imagens representativas dos grupos sem manifestação de AR: marcação de imunofluorescência para CD31 (verde) e CD34 (vermelho) com contra coloração DAPI (azul) para núcleos, respectivamente. **D e B,** imagens representativas do grupo com manifestação de AR: marcação de imunofluorescência para CD31 (verde) e CD34 (vermelho) com contra coloração DAPI (azul) para núcleos**.**

Ao quantificarmos a intensidade de fluorescência para marcação de CD31, houve diferença significativa (p<0,05) nos grupos que receberam a indução da artrite em comparação ao WT C. Em contrapartida, não houve diferença para a marcação de CD34, entre os grupos avaliados (**Figura 16A e 16B, respectivamente)**.

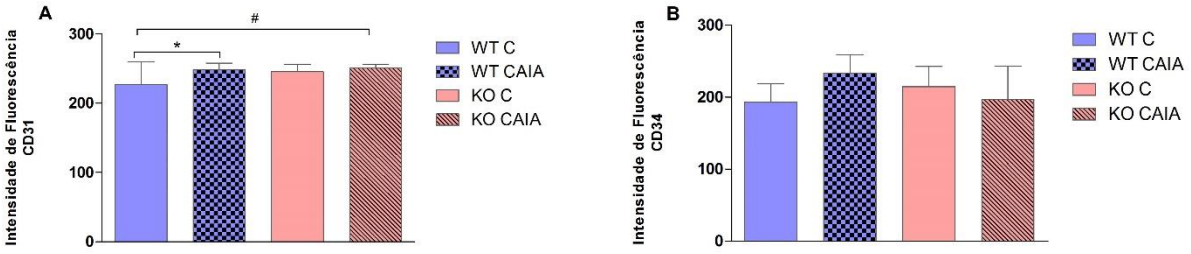


Figura 16. Análise comparativa da intensidade de fluorescência para CD31 (A) e CD34 (B) entre os grupos controles WT C e KO C, e experimentais WT CAIA e KO CAIA. *One-way ANOVA*, com pós teste de *Tukey* (means ± SD). GraphPad Prisma 5. *, # p<0.05

Análise proteômica

A análise proteômica identificou proteínas baseadas em 4 comparações: 1. WT CAIA vs. WT C; 2. KO CAIA vs. KO C; 3. KO C vs. WT C; 4. KO CAIA vs. WT CAIA Resultados da comparação 1. WT CAIA vs. WT C demonstraram a identificação de um total de 325 e 147 proteínas, respectivamente, sendo 138 proteínas em comum em ambos os grupos (**Figura 17A**). Destas, 187 proteínas foram identificadas exclusivamente no grupo WT CAIA, como por exemplo, *Asporin*, 3 isoformas de Colágeno, 3 isoformas de Copine, *Decorin*, *Fibronectin, Hemopexin*, 5 isoformas de Histonas, 7 isoformas de Immunoglobulinas, 34 isoformas de Queratina, *Moesin, Myoglobin, Periostin, Proteina S100-A6* e *-A9*, *Serotransferrin, Striatin-4* e 15 isoformas de Tubulina, enquanto que 9 proteínas foram identificadas unicamente no grupo WT C.

Ao compararmos 2. KO CAIA *vs.* KO C, o número total de proteínas identificadas foram 330 e 313, respectivamente, das quais, 256 proteínas foram em comum entre ambos os grupos (**Figura 17B**). Adicionalmente, 74 proteínas foram exclusivas do grupo KO CAIA, como por exemplo, *Angiopoietin-2, Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial, Lactotransferrin, Moesin* e *Proto-oncogene c-Fos*,

enquanto que 57 proteínas foram únicas para KO C, como *Calcium-activated potassium channel subunit beta-2, Cytochrome P450 2C39* e *Protein S100-A6*.

Ao compararmos os grupos controles, KO C *vs* WT C um total de 302 e 147 proteínas foram identificadas, respectivamente, sendo 139 proteínas presente em ambos os grupos (**Figura 17C**). Um total de 163 proteínas foram identificadas exclusivamente no grupo KO C, como *Calcium-activated potassium channel subunit, Calcium-binding mitochondrial carrier protein, Cartilage oligomeric matrix protein*, 3 isoformas da proteína alfa do colágeno, *Histone H4*, 39 isoformas de Queratina, *Mimecan, Myoglobin, Protein S100-A6, Serotransferrin, Thrombospondin-4* e 14 isoformas de Tubulina, enquanto 8 proteínas foram identificadas exclusivamente em WT C.

Quanto à comparação dos grupos que receberam a indução da artrite reumatoide, KO CAIA *vs* WT CAIA, 335 proteínas foram identificadas em ambos grupos, sendo 248 em comum entre eles (**Figura 17D**). Dentre as proteínas identificadas no grupo KO CAIA, 87 foram exclusivas deste grupo como, Angiopoietin-2, Calcium-binding mitochondrial carrier protein, *Cartilage oligomeric matrix protein, Cochlin,* 3 isoformas do Citocromo c, *Cytochrome P450 2C55, Lactotransferrin* e *Plectin*, a mesma quantidade de proteínas exclusivas foram identificadas no grupo WT CAIA, 87 como a *Calcineurin B homologous protein 3*, 3 isoformas de Copine protein, *Fibrinogen alpha chain and gamma chain, Fibronectin*, 7 isoformas de Imunoglobulinas, *Protein S100-A6* and *-A9, Striatin-4* and *Tropomyosin alpha-4 chain*.

Enfatizamos ainda a exclusividade das proteínas *Glutathione S-transferase Mu1*, *2, 4, 5* e *7*; no grupo KO CAIA, tanto nas comparações KO CAIA vs KO C e KO CAIA vs WT CAIA, envolvidos na formação de conjugados de glutationa de prostaglandina A2 (PGA2) e prostaglandina J2 (PGJ2), participando ainda, da formação de novos regioisômeros de hepoxilina, envolvida na produção de metabólitos no desenvolvimento e resolução da inflamação.

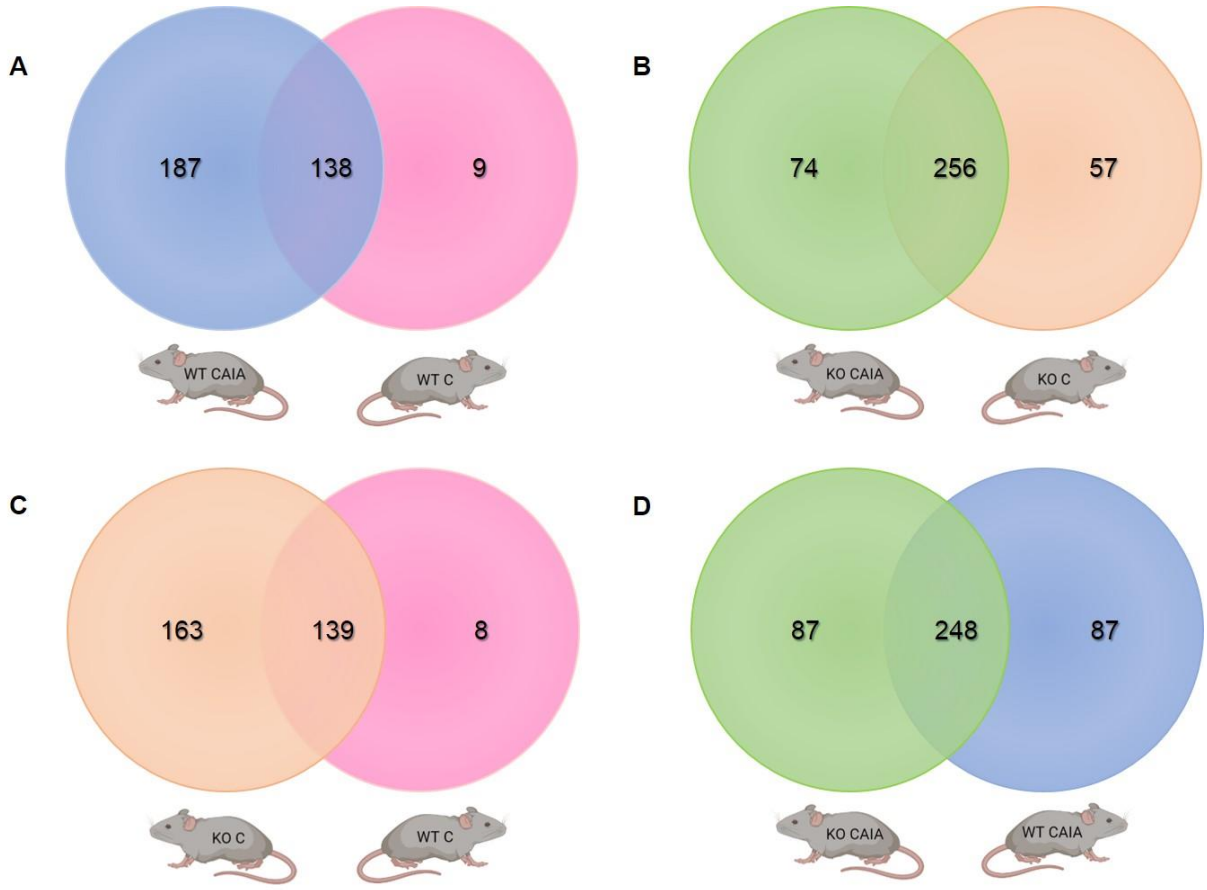


Figura 17. Diagrama de Venn representando as proteínas exclusivas de cada grupo e nas intersecções, as proteínas em comum, identificadas na análise proteômica das patas anteriores e posteriores dos quatro grupos, WT CAIA – *Wild type* com artrite induzida; WT C – *Wild type* controle; KO CAIA – 5-LO KO com artrite induzida; KO C – 5-LO KO controle (Bioinformatics & Evolutionary Genomics). http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/

Em relação as proteínas expressas diferencialmente, 95 proteínas encontraram-se superexpressas no WT CAIA, como, 7 isoformas de Miosina, 2 isoformas de Tropomyosin (*Tropomyosin beta chain* and *Tropomyosin alpha-3 chain*) 9 isoformas de Actina, *Calsequestrin-1, 4.5 LIM domains protein 1, Sarcalumenin*, 8 isoformas de Queratina (aumentadas mais de 4x), 5 isoformas de Hemoglobina com aumento mais de 2x (*Hemoglobin subunit alpha, Hemoglobin subunit epsilon-Y2, Hemoglobin subunit zeta, Hemoglobin subunit beta-1* e *beta-2*), *Desmin*, 32 isoformas de Histona (aproximadamente 5x aumentadas), *Carbonic anhydrase 3*, *Alpha-internexin,* 3 isoformas of Neurofilament, *Collagen alpha-2(I) chain* (aumento de 5x), *Fibromodulin* (aumentadas mais de 5x), *Albumin* (aumentadas mais de 5x) e *Collagen alpha-1(I) chain* (aumento de quase 7x), enquanto que 10 proteínas apresentaram-se diminuídas no WT CAIA, em comparação ao WT C, como *Tropomyosin alpha-1 chain*,

3 isoformas of Miosina, *Parvalbumin alpha, Creatine kinase M-type* and *Troponin T_ fast skeletal muscle* (**Tabela 3**).

Em relação as proteínas diferencialmente expressas, 57 e 126 foram identificadas aumentadas e diminuídas, respectivamente no grupo KO CAIA em comparação ao KO C. Entre as proteínas reguladas positivamente no KO CAIA estão: 20 isoformas de Histona H2A (aumento de mais de 2 vezes), *Carbonic anhydrase 3, Sarcalumenin, Myoglobin*, 3 isoformas da proteína da hemoglobina (*Hemogloblin subunit alpha, Hemoglobin subunit beta-1* and *-2*), *Collagen alpha-1(I) chain* and *-2(I) chain* e *Albumin*. Por outro lado, 44 isoformas de Queratina (algumas com uma diminuição de mais de 2 vezes), 12 isoformas de proteínas de miosina, *Calsequestrin-1, Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1, Collagen alpha-1(VI) chain, Tropomyosin alpha-1 chain, L-lactate dehydrogenase A chain, Decorin, Biglycan, Hemoglobin subunit zeta* e 17 isoformas de Histona estavam reguladas negativamente no KO CAIA (**Tabela 4**).

Quanto a comparação dos grupos KO CAIA vs WT CAIA na diferença de expressão, 108 e 42 proteínas foram identificadas aumentadas e diminuídas, respectivamente. Entre as proteínas reguladas positivamente no KO CAIA estão *AFG3-like protein 1* (aumento mais de 3 vezes), *Ecotropic viral integration site 5 protein* (aumento mais de 3 vezes), 31 isoformas de Quetarina (algumas isoformas com um aumento de mais de 2 vezes), *Aconitate hydratase_ mitochondrial, Decorin*, *Hemoglobin subunit beta-1, Myoglobin, Four and a half LIM domains protein 1, Prolargin, Asporin, Sarcalumenin, Calsequestrin-1 e Troponin T_ fast skeletal muscle.* Entre as proteínas reguladas negativamente estão 3 isoformas de hemoglobina (*Hemoglobin subunit epsilon-Y2, Hemoglobin subunit beta-2* e *Hemoglobin subunit zeta* (diminuição de quase 3 vezes)), 2 isoformas de peroxirredoxina (*Peroxiredoxin-4* e *-1*), *Hemopexin* (diminuição de 2 vezes) e *Paralbumin alpha* (diminuição de 2 vezes), 5 isoformas de actina, *Albumin, Serotransferrin*, *Carbonic anhydrase 3*, 2 isoformas de tropomiosina, 5 isoformas de histona, *Lumican, Creatine kinase M-type* e 2 isoformas de miosina (*Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform* e *Myosin light chain 3*) (**Tabela 5**).

Em relação as proteínas diferencialmente expressas na comparação entre os grupos controle KO C vs WT C, 118 e 2 proteínas, foram identificadas aumentadas e diminuídas, respectivamente, no grupo KO C. Entre as proteínas reguladas

positivamente estão: 28 isoformas de histona (isoformas de histona H2B com aumento de mais de 6 vezes), fibromodulina (aumento de quase 13 vezes), 8 isoformas de queratina (registrando aumento de mais de 22 vezes), 3 isoformas de tropomiosina, 3 isoformas de hemoglobina (*Hemoglobin subunit zeta, Hemoglobin subunit beta-1* e *beta-2*), *Four and a half LIM domains protein 1* e 14 isoformas de proteína miosina. Entretanto, as proteínas *Parvalbumin alpha* e *Myosin light polypeptide 6 estavam* reguladas negativamente no KO C quando comparado ao grupo WT C (**Tabela 6**).

Tabela 3. Proteínas com expressão significativamente alteradas no grupo WT CAIA (camundongos com artrite induzida) em comparação com o grupo controle WT C.

°Access Number	Protein Name	*PLGS* Score	+Ratio WT CAIA:WT C	*P*
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	47	6.96	<0.01
P07724	Albumin	1274	5.47	<0.01
P50608	Fibromodulin	83	5.26	<0.01
Q01149	Collagen alpha-2(I) chain	67	5.00	<0.01
Q6IFZ6	Keratin_ type II cytoskeletal 1b	52	4.62	<0.01
Q3TTY5	Keratin_ type II cytoskeletal 2 epidermal	69	4.44	<0.01
P04104	Keratin_ type II cytoskeletal 1	90	4.35	<0.01
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	137	4.14	<0.01
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	137	4.10	<0.01
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	137	4.10	<0.01
Q9D2U9	Histone H2B type 3-A	137	4.10	<0.01
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	137	4.06	<0.01
Q8CGP0	Histone H2B type 3-B	137	4.06	<0.01
Q64475	Histone H2B type 1-B	137	4.01	<0.01
Q64525	Histone H2B type 2-B	137	4.01	<0.01
Q64524	Histone H2B type 2-E	137	4.01	<0.01
P02535	Keratin_ type I cytoskeletal 10	87	4.01	<0.01
P70696	Histone H2B type 1-A	137	3.97	<0.01
Q64478	Histone H2B type 1-H	137	3.97	<0.01
P10854	Histone H2B type 1-M	137	3.97	<0.01
C0HKE6	Histone H2A type 1-I	1119	2.92	<0.01
C0HKE8	Histone H2A type 1-O	1119	2.86	<0.01
C0HKE3	Histone H2A type 1-D	1119	2.83	<0.01
Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	1119	2.83	<0.01
Q6GSS7	Histone H2A type 2-A	1119	2.83	<0.01
Q64523	Histone H2A type 2-C	1119	2.83	<0.01

P08553	**Neurofilament medium polypeptide**	**58**	**2.83**	**<0.01**
C0HKE1	**Histone H2A type 1-B**	**1119**	**2.80**	**<0.01**
C0HKE7	**Histone H2A type 1-N**	**1119**	**2.80**	**<0.01**
C0HKE4	**Histone H2A type 1-E**	**1119**	**2.77**	**<0.01**
Q8CGP6	**Histone H2A type 1-H**	**1119**	**2.77**	**<0.01**
Q8CGP7	**Histone H2A type 1-K**	**1119**	**2.77**	**<0.01**
C0HKE9	**Histone H2A type 1-P**	**1119**	**2.77**	**<0.01**
Q8R1M2	**Histone H2A.J**	**1119**	**2.77**	**<0.01**
P46660	**Alpha-internexin**	**51**	**2.75**	**<0.01**
C0HKE2	**Histone H2A type 1-C**	**1119**	**2.75**	**<0.01**
P19246	**Neurofilament heavy polypeptide**	**51**	**2.75**	**<0.01**
P08551	**Neurofilament light polypeptide**	**51**	**2.75**	**<0.01**
C0HKE5	**Histone H2A type 1-G**	**1119**	**2.69**	**<0.01**
Q8BFU2	**Histone H2A type 3**	**1119**	**2.66**	**<0.01**
P06467	**Hemoglobin subunit zeta**	**138**	**2.61**	**<0.01**
P16015	**Carbonic anhydrase 3**	**1699**	**2.48**	**<0.01**
Q64522	**Histone H2A type 2-B**	**172**	**2.44**	**<0.01**
P0C0S6	**Histone H2A.Z**	**172**	**2.39**	**<0.01**
Q3THW5	**Histone H2A.V**	**172**	**2.36**	**<0.01**
P27661	**Histone H2AX**	**172**	**2.34**	**<0.01**
P02089	**Hemoglobin subunit beta-2**	**1550**	**2.29**	**<0.01**
P02088	**Hemoglobin subunit beta-1**	**3638**	**2.25**	**<0.01**
P02104	**Hemoglobin subunit epsilon-Y2**	**327**	**2.20**	**<0.01**
P0CG50	**Polyubiquitin-C**	**988**	**2.18**	**<0.01**
P62983	**Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a**	**988**	**2.18**	**<0.01**
P62984	**Ubiquitin-60S ribosomal protein L40**	**988**	**2.18**	**<0.01**
P0CG49	**Polyubiquitin-B**	**988**	**2.16**	**<0.01**
P31001	**Desmin**	**97**	**2.14**	**<0.01**
P01942	**Hemoglobin subunit alpha**	**3617**	**2.14**	**<0.01**
P15532	Nucleoside diphosphate kinase A	149	1.99	<0.01

P35700	Peroxiredoxin-1	193	1.93	<0.01
O08807	Peroxiredoxin-4	132	1.93	<0.01
Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B	149	1.92	<0.01
Q922U2	Keratin_ type II cytoskeletal 5	61	1.90	<0.01
P50446	Keratin_ type II cytoskeletal 6A	61	1.88	<0.01
Q9Z331	Keratin_ type II cytoskeletal 6B	62	1.86	<0.01
Q7TPR4	Alpha-actinin-1	13	1.80	<0.01
Q9JI91	Alpha-actinin-2	137	1.70	<0.01
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	314	1.63	0.02
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	107	1.62	<0.01
Q8BGZ7	Keratin_ type II cytoskeletal 75	61	1.58	<0.01
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	45	1.57	0.01
Q7TQ48	Sarcalumenin	67	1.51	<0.01
P97447	Four and a half LIM domains protein 1	73	1.36	<0.01
O09165	Calsequestrin-1	282	1.31	<0.01
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	1473	1.25	<0.01
P60710	Actin_ cytoplasmic 1	7117	1.21	<0.01
P63260	Actin_ cytoplasmic 2	7117	1.21	<0.01
P56480	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	710	1.21	<0.01
P62737	Actin_ aortic smooth muscle	14275	1.20	<0.01
P68033	Actin_ alpha cardiac muscle 1	14275	1.19	<0.01
P68134	Actin_ alpha skeletal muscle	18530	1.19	<0.01
P63268	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	13176	1.19	<0.01
O88990	Alpha-actinin-3	412	1.19	<0.01
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	50	1.17	0.01
P21107	Tropomyosin alpha-3 chain	2240	1.16	<0.01
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	878	1.15	<0.01
Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	350	1.15	0.04
Q03265	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial	403	1.13	<0.01
P58774	Tropomyosin beta chain	8907	1.12	<0.01

P17182	Alpha-enolase	767	1.11	<0.01
Q5SX40	Myosin-1	6403	1.11	<0.01
P13542	Myosin-8	6280	1.11	<0.01
P13541	Myosin-3	2669	1.07	<0.01
Q5SX39	Myosin-4	8788	1.07	<0.01
Q91Z83	Myosin-7	2683	1.07	<0.01
Q02566	Myosin-6	2638	1.06	<0.01
P21550	Beta-enolase	5170	1.06	0.02
A2AQP0	Myosin-7B	1109	1.04	0.01
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	3826	0.92	<0.01
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8361	0.91	<0.01
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	9985	0.90	<0.01
O70250	Phosphoglycerate mutase 2	368	0.85	<0.01
P97457	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	9779	0.84	<0.01
Q60605	Myosin light polypeptide 6	355	0.82	<0.01
Q5XKE0	Myosin-binding protein C_ fast-type	88	0.76	<0.01
P32848	Parvalbumin alpha	5745	0.75	<0.01
P07310	Creatine kinase M-type	8350	0.73	<0.01
Q9QZ47	Troponin T_ fast skeletal muscle	254	0.65	0.01
Q9CQV8	14-3-3 protein beta/alpha	266	WT CAIA*	-
P62259	14-3-3 protein epsilon	266	WT CAIA*	-
P68510	14-3-3 protein eta	266	WT CAIA*	-
P61982	14-3-3 protein gamma	266	WT CAIA*	-
O70456	14-3-3 protein sigma	266	WT CAIA*	-
P68254	14-3-3 protein theta	266	WT CAIA*	-
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	396	WT CAIA*	-
P14869	60S acidic ribosomal protein P0	127	WT CAIA*	-
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	395	WT CAIA*	-
P31786	Acyl-CoA-binding protein	550	WT CAIA*	-
Q920A7	AFG3-like protein 1	71	WT CAIA*	-

P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	275	WT CAIA*	-
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	297	WT CAIA*	-
Q00896	Alpha-1-antitrypsin 1-3	275	WT CAIA*	-
Q00897	Alpha-1-antitrypsin 1-4	275	WT CAIA*	-
Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5	63	WT CAIA*	-
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	242	WT CAIA*	-
P57780	Alpha-actinin-4	131	WT CAIA*	-
P23927	Alpha-crystallin B chain	115	WT CAIA*	-
A2AS55	Ankyrin repeat domain-containing protein 16	91	WT CAIA*	-
P10107	Annexin A1	121	WT CAIA*	-
P07356	Annexin A2	121	WT CAIA*	-
Q00623	Apolipoprotein A-I	585	WT CAIA*	-
P06728	Apolipoprotein A-IV	134	WT CAIA*	-
Q8K2H4	Arf-GAP with coiled-coil_ ANK repeat and PH domain-containing protein 1	52	WT CAIA*	-
Q922B2	Aspartate--tRNA ligase_ cytoplasmic	49	WT CAIA*	-
Q99MQ4	Asporin	363	WT CAIA*	-
Q9DC29	ATP-binding cassette sub-family B member 6_ mitochondrial	109	WT CAIA*	-
P28653	Biglycan	94	WT CAIA*	-
Q9JKL5	Calcineurin B homologous protein 3	73	WT CAIA*	-
P0DP26	Calmodulin-1	364	WT CAIA*	-
P0DP27	Calmodulin-2	364	WT CAIA*	-
P0DP28	Calmodulin-3	364	WT CAIA*	-
Q9D6P8	Calmodulin-like protein 3	38	WT CAIA*	-
Q99KF0	Caspase recruitment domain-containing protein 14	54	WT CAIA*	-
Q640L3	Cell cycle progression protein 1	61	WT CAIA*	-
O35744	Chitinase-like protein 3	354	WT CAIA*	-
Q91Z98	Chitinase-like protein 4	84	WT CAIA*	-
Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain	86	WT CAIA*	-
Q60847	Collagen alpha-1(XII) chain	49	WT CAIA*	-
Q02788	Collagen alpha-2(VI) chain	102	WT CAIA*	-

P01027	Complement C3	87	WT CAIA*	-
Q8JZW4	Copine-5	68	WT CAIA*	-
Q9DC53	Copine-8	37	WT CAIA*	-
Q1RLL3	Copine-9	37	WT CAIA*	-
Q8K3G9	DCC-interacting protein 13-beta	66	WT CAIA*	-
P28654	Decorin	910	WT CAIA*	-
Q7M6Y5	Deuterosome assembly protein 1	58	WT CAIA*	-
Q9DBT9	Dimethylglycine dehydrogenase_ mitochondrial	37	WT CAIA*	-
P35761	Dual specificity protein kinase TTK	49	WT CAIA*	-
P97366	Ecotropic viral integration site 5 protein	100	WT CAIA*	-
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	146	WT CAIA*	-
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	136	WT CAIA*	-
P58252	Elongation factor 2	49	WT CAIA*	-
Q91VC3	Eukaryotic initiation factor 4A-III	95	WT CAIA*	-
P47754	F-actin-capping protein subunit alpha-2	76	WT CAIA*	-
P04117	Fatty acid-binding protein_ adipocyte	830	WT CAIA*	-
Q9CPU7	F-box only protein 32	58	WT CAIA*	-
E9PV24	Fibrinogen alpha chain	75	WT CAIA*	-
Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain	214	WT CAIA*	-
P11276	Fibronectin	110	WT CAIA*	-
Q3TFK5	G patch domain-containing protein 4	69	WT CAIA*	-
P16045	Galectin-1	94	WT CAIA*	-
P06745	Glucose-6-phosphate isomerase	69	WT CAIA*	-
Q9DCZ1	GMP reductase 1	92	WT CAIA*	-
Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A	95	WT CAIA*	-
P17879	Heat shock 70 kDa protein 1B	92	WT CAIA*	-
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	79	WT CAIA*	-
Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial	74	WT CAIA*	-
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	82	WT CAIA*	-
P11499	Heat shock protein HSP 90-beta	127	WT CAIA*	-

Q6PCN7	Helicase-like transcription factor	44	WT CAIA*	-
Q91X72	Hemopexin	91	WT CAIA*	-
P68433	Histone H3.1	237	WT CAIA*	-
P84228	Histone H3.2	237	WT CAIA*	-
P84244	Histone H3.3	237	WT CAIA*	-
P02301	Histone H3.3C	237	WT CAIA*	-
P62806	Histone H4	1736	WT CAIA*	-
P01864	Ig gamma-2A chain C region secreted form	206	WT CAIA*	-
P01863	Ig gamma-2A chain C region_ A allele	206	WT CAIA*	-
P01865	Ig gamma-2A chain C region_ membrane-bound form	206	WT CAIA*	-
P01867	Ig gamma-2B chain C region	274	WT CAIA*	-
P03987	Ig gamma-3 chain C region	107	WT CAIA*	-
P01872	Immunoglobulin heavy constant mu	118	WT CAIA*	-
Q9EQS9	Immunoglobulin superfamily DCC subclass member 4	50	WT CAIA*	-
O35345	Importin subunit alpha-7	104	WT CAIA*	-
Q3USB7	Inactive phospholipase C-like protein 1	234	WT CAIA*	-
P15975	Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 53	35	WT CAIA*	-
Q80V72	Inositol hexakisphosphate kinase 2	85	WT CAIA*	-
Q61739	Integrin alpha-6	72	WT CAIA*	-
P70434	Interferon regulatory factor 7	83	WT CAIA*	-
O35368	Interferon-activable protein 203	65	WT CAIA*	-
Q61765	Keratin_ type I cuticular Ha1	424	WT CAIA*	-
Q62168	Keratin_ type I cuticular Ha2	185	WT CAIA*	-
Q8K0Y2	Keratin_ type I cuticular Ha3-I	239	WT CAIA*	-
Q61897	Keratin_ type I cuticular Ha3-II	430	WT CAIA*	-
Q9D646	Keratin_ type I cuticular Ha4	239	WT CAIA*	-
Q497I4	Keratin_ type I cuticular Ha5	231	WT CAIA*	-
B1AQ75	Keratin_ type I cuticular Ha6	288	WT CAIA*	-
P08730	Keratin_ type I cytoskeletal 13	185	WT CAIA*	-
Q61781	Keratin_ type I cytoskeletal 14	597	WT CAIA*	-

Q61414	Keratin_ type I cytoskeletal 15	530	WT CAIA*	-
Q9Z2K1	Keratin_ type I cytoskeletal 16	352	WT CAIA*	-
Q9QWL7	Keratin_ type I cytoskeletal 17	412	WT CAIA*	-
P05784	Keratin_ type I cytoskeletal 18	185	WT CAIA*	-
P19001	Keratin_ type I cytoskeletal 19	397	WT CAIA*	-
A1L317	Keratin_ type I cytoskeletal 24	185	WT CAIA*	-
Q8VCW2	Keratin_ type I cytoskeletal 25	167	WT CAIA*	-
Q9Z320	Keratin_ type I cytoskeletal 27	167	WT CAIA*	-
A6BLY7	Keratin_ type I cytoskeletal 28	185	WT CAIA*	-
Q6IFX3	Keratin_ type I cytoskeletal 40	241	WT CAIA*	-
Q6IFX2	Keratin_ type I cytoskeletal 42	362	WT CAIA*	-
Q6IMF0	Keratin_ type II cuticular 87	70	WT CAIA*	-
Q9ERE2	Keratin_ type II cuticular Hb1	65	WT CAIA*	-
Q99M73	Keratin_ type II cuticular Hb4	62	WT CAIA*	-
Q9Z2T6	Keratin_ type II cuticular Hb5	70	WT CAIA*	-
P97861	Keratin_ type II cuticular Hb6	78	WT CAIA*	-
Q3UV17	Keratin_ type II cytoskeletal 2 oral	44	WT CAIA*	-
P07744	Keratin_ type II cytoskeletal 4	44	WT CAIA*	-
Q9DCV7	Keratin_ type II cytoskeletal 7	46	WT CAIA*	-
Q9R0H5	Keratin_ type II cytoskeletal 71	74	WT CAIA*	-
Q6IME9	Keratin_ type II cytoskeletal 72	54	WT CAIA*	-
Q6NXH9	Keratin_ type II cytoskeletal 73	85	WT CAIA*	-
Q6IFZ9	Keratin_ type II cytoskeletal 74	74	WT CAIA*	-
Q8VED5	Keratin_ type II cytoskeletal 79	50	WT CAIA*	-
P11679	Keratin_ type II cytoskeletal 8	87	WT CAIA*	-
Q8VCX6	KICSTOR complex protein kaptin	99	WT CAIA*	-
P33175	Kinesin heavy chain isoform 5A	57	WT CAIA*	-
Q52KG5	Kinesin-like protein KIF26A	39	WT CAIA*	-
Q6PB66	Leucine-rich PPR motif-containing protein_ mitochondrial	37	WT CAIA*	-
Q9DB40	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 27	77	WT CAIA*	-

P26041	Moesin	77	WT CAIA*	-
P04247	Myoglobin	230	WT CAIA*	-
P82343	N-acylglucosamine 2-epimerase	42	WT CAIA*	-
O08692	Neutrophilic granule protein	1130	WT CAIA*	-
Q9R207	Nibrin	46	WT CAIA*	-
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	221	WT CAIA*	-
Q62009	Periostin	104	WT CAIA*	-
P15331	Peripherin	56	WT CAIA*	-
Q9D4H9	PHD finger protein 14	53	WT CAIA*	-
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	105	WT CAIA*	-
Q61233	Plastin-2	75	WT CAIA*	-
Q99K51	Plastin-3	40	WT CAIA*	-
Q61838	Pregnancy zone protein	166	WT CAIA*	-
P62962	Profilin-1	803	WT CAIA*	-
Q9JK53	Prolargin	748	WT CAIA*	-
P14069	Protein S100-A6	433	WT CAIA*	-
P31725	Protein S100-A9	229	WT CAIA*	-
Q9JM99	Proteoglycan 4	38	WT CAIA*	-
Q9D051	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta_ mitochondrial	135	WT CAIA*	-
P26043	Radixin	48	WT CAIA*	-
Q91YM2	Rho GTPase-activating protein 35	112	WT CAIA*	-
P42208	Septin-2	89	WT CAIA*	-
P29621	Serine protease inhibitor A3C	119	WT CAIA*	-
Q80X76	Serine protease inhibitor A3F	119	WT CAIA*	-
Q5I2A0	Serine protease inhibitor A3G	50	WT CAIA*	-
P07759	Serine protease inhibitor A3K	824	WT CAIA*	-
Q03734	Serine protease inhibitor A3M	119	WT CAIA*	-
Q91WP6	Serine protease inhibitor A3N	50	WT CAIA*	-
Q0VGB7	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2	252	WT CAIA*	-
Q921I1	Serotransferrin	502	WT CAIA*	-

Q8BQM7	Single-pass membrane and coiled-coil domain-containing protein 3	99	WT CAIA*	-
P58404	Striatin-4	53	WT CAIA*	-
Q9JKT2	Taste receptor type 2 member 119	48	WT CAIA*	-
P10639	Thioredoxin	269	WT CAIA*	-
P15806	Transcription factor E2-alpha	86	WT CAIA*	-
Q9WVA4	Transgelin-2	134	WT CAIA*	-
P40142	Transketolase	85	WT CAIA*	-
Q8C3X4	Translation factor Guf1_ mitochondrial	42	WT CAIA*	-
Q3UX10	Tubulin alpha chain-like 3	63	WT CAIA*	-
P68369	Tubulin alpha-1A chain	169	WT CAIA*	-
P05213	Tubulin alpha-1B chain	169	WT CAIA*	-
P68373	Tubulin alpha-1C chain	171	WT CAIA*	-
P05214	Tubulin alpha-3 chain	132	WT CAIA*	-
P68368	Tubulin alpha-4A chain	132	WT CAIA*	-
Q9JJZ2	Tubulin alpha-8 chain	132	WT CAIA*	-
A2AQ07	Tubulin beta-1 chain	253	WT CAIA*	-
Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	411	WT CAIA*	-
Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	411	WT CAIA*	-
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	402	WT CAIA*	-
Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	224	WT CAIA*	-
P68372	Tubulin beta-4B chain	296	WT CAIA*	-
P99024	Tubulin beta-5 chain	500	WT CAIA*	-
Q922F4	Tubulin beta-6 chain	204	WT CAIA*	-
Q5I043	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	61	WT CAIA*	-
Q9D906	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	119	WT CAIA*	-
O09053	Werner syndrome ATP-dependent helicase homolog	59	WT CAIA*	-
E9Q309	Centrosome-associated protein 350	42	WT C*	-
Q8CDI6	Coiled-coil domain-containing protein 158	44	WT C*	-
Q8BVF4	Coiled-coil domain-containing protein 30	23	WT C*	-
P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial	468	WT C*	-

Q9WVF7	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	30	WT C*	-
Q2MHE5	Docking protein 6	180	WT C*	-
Q9D312	Keratin_ type I cytoskeletal 20	40	WT C*	-
Q69ZB0	Leucine-rich repeat and coiled-coil domain-containing protein 1	48	WT C*	-
Q8VC23	Uncharacterized protein C11orf86 homolog	175	WT C*	-

°Identificação baseada no ID das proteínas do banco de dados *Uniprot Database* (http://wwwwww.uniprot.org/).
+Proteínas com expressão significativamente alterada estão organizadas de acordo com a razão.
A expressão diferencial entre os grupos foi expressa em $p < 0.05$. Proteínas destacadas em negrito encontram-se aumentadas ou diminuídas mais que 2 vezes.
* Proteínas únicas de cada grupo, dentro dessa comparação.

Tabela 4. Proteínas com expressão significativamente alteradas no grupo KO CAIA (camundongos com artrite induzida) em comparação com o grupo controle KO C.

°Access Number	Protein Name	*PLGS* Score	+Ratio KO CAIA:KO C	*P*
P20152	Vimentin	7381	3.39	<0.01
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	353	2.80	<0.01
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	589	2.61	<0.01
Q01149	Collagen alpha-2(I) chain	885	2.56	<0.01
Q9D0I9	Arginine--tRNA ligase_ cytoplasmic	54	2.56	0.03
P46660	Alpha-internexin	613	2.44	<0.01
P19246	Neurofilament heavy polypeptide	670	2.39	<0.01
P08551	Neurofilament light polypeptide	613	2.36	<0.01
Q24JP4	Uncharacterized protein C5orf47 homolog	145	2.32	0.04
P08553	Neurofilament medium polypeptide	613	2.20	<0.01
P07724	Albumin	6195	2.08	<0.01
C0HKE1	Histone H2A type 1-B	23784	2.08	<0.01
C0HKE3	Histone H2A type 1-D	23784	2.08	<0.01
C0HKE4	Histone H2A type 1-E	23784	2.08	<0.01
C0HKE5	Histone H2A type 1-G	23784	2.08	<0.01
Q8CGP6	Histone H2A type 1-H	23784	2.08	<0.01
Q8CGP7	Histone H2A type 1-K	23784	2.08	<0.01
C0HKE7	Histone H2A type 1-N	23784	2.08	<0.01
C0HKE8	Histone H2A type 1-O	23784	2.08	<0.01
Q6GSS7	Histone H2A type 2-A	23784	2.08	<0.01
Q64523	Histone H2A type 2-C	23784	2.08	<0.01
C0HKE2	Histone H2A type 1-C	23784	2.05	<0.01
C0HKE6	Histone H2A type 1-I	23830	2.05	<0.01
C0HKE9	Histone H2A type 1-P	23784	2.05	<0.01
Q8BFU2	Histone H2A type 3	23784	2.05	<0.01
Q8R1M2	Histone H2A.J	23784	2.05	<0.01

P02089	Hemoglobin subunit beta-2	3317	1.95	<0.01
P01942	Hemoglobin subunit alpha	2871	1.93	<0.01
Q3THW5	Histone H2A.V	1176	1.92	<0.01
Q64522	Histone H2A type 2-B	1176	1.90	<0.01
P0C0S6	Histone H2A.Z	1176	1.90	<0.01
P27661	Histone H2AX	1176	1.86	<0.01
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	11721	1.82	<0.01
Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	23784	1.82	<0.01
P0CG49	Polyubiquitin-B	3709	1.54	<0.01
P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	63	1.52	<0.01
P0CG50	Polyubiquitin-C	3709	1.52	<0.01
P62983	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	3709	1.52	<0.01
Q9QZ47	Troponin T_ fast skeletal muscle	105	1.48	<0.01
P04247	Myoglobin	620	1.42	<0.01
P06745	Glucose-6-phosphate isomerase	90	1.38	0.03
P97447	Four and a half LIM domains protein 1	274	1.35	<0.01
Q99KI0	Aconitate hydratase_ mitochondrial	129	1.32	<0.01
Q9JI91	Alpha-actinin-2	1012	1.25	<0.01
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	142	1.23	<0.01
P68033	Actin_ alpha cardiac muscle 1	23599	1.21	<0.01
P62737	Actin_ aortic smooth muscle	23599	1.21	<0.01
Q7TQ48	Sarcalumenin	245	1.19	<0.01
P63260	Actin_ cytoplasmic 2	15599	1.15	<0.01
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	4646	1.14	<0.01
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	521	1.14	<0.01
P56480	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	1173	1.13	<0.01
P14152	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	541	1.12	<0.01
P16015	Carbonic anhydrase 3	5464	1.11	<0.01
Q03265	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial	743	1.07	0.01
P08249	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	818	1.06	0.04

P68134	Actin_ alpha skeletal muscle	26396	1.03	<0.01
P60710	Actin_ cytoplasmic 1 1	15599	0.97	<0.01
P58774	Tropomyosin beta chain	4254	0.95	0.04
P52480	Pyruvate kinase PKM	3057	0.95	<0.01
P17182	Alpha-enolase	789	0.93	0.01
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7894	0.93	<0.01
Q5SX40	Myosin-1	7465	0.92	<0.01
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	4164	0.91	<0.01
P17183	Gamma-enolase	332	0.90	0.02
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase_ muscle form	380	0.90	<0.01
P13542	Myosin-8	5250	0.90	<0.01
P31001	Desmin	1129	0.90	0.01
Q02566	Myosin-6	2284	0.90	<0.01
Q91Z83	Myosin-7	2325	0.90	<0.01
P57780	Alpha-actinin-4	163	0.89	0.04
O09165	Calsequestrin-1	670	0.89	<0.01
P13541	Myosin-3	2493	0.88	<0.01
P21550	Beta-enolase	2931	0.86	<0.01
P05977	Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform	9138	0.86	<0.01
Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	424	0.85	0.01
P68372	Tubulin beta-4B chain	479	0.85	<0.01
A2AQP0	Myosin-7B	680	0.84	<0.01
Q8R429	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	68	0.84	<0.01
Q8CI43	Myosin light chain 6B	271	0.84	<0.01
Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	483	0.83	<0.01
Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain	227	0.82	<0.01
Q5SX39	Myosin-4	5848	0.82	<0.01
Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	483	0.82	<0.01
P13412	Troponin I_ fast skeletal muscle	69	0.80	<0.01
P99024	Tubulin beta-5 chain	636	0.80	<0.01

P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	5786	0.79	<0.01
Q3TTY5	Keratin_ type II cytoskeletal 2 epidermal	7594	0.78	<0.01
P07356	Annexin A2	467	0.77	<0.01
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	1154	0.77	<0.01
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	299	0.76	<0.01
Q99MQ4	Asporin	685	0.76	<0.01
Q00897	Alpha-1-antitrypsin 1-4	299	0.75	0.01
Q9Z1T2	Thrombospondin-4	142	0.74	0.04
Q9JIK5	Nucleolar RNA helicase 2	40	0.74	0.01
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	299	0.74	<0.01
Q60847	Collagen alpha-1(XII) chain	56	0.74	<0.01
O54974	Galectin-7	353	0.73	0.03
Q9JK53	Prolargin	706	0.72	<0.01
P04104	Keratin_ type II cytoskeletal 1	4774	0.71	<0.01
O70250	Phosphoglycerate mutase 2	483	0.70	<0.01
P48678	Prelamin-A/C	285	0.70	<0.01
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	671	0.70	<0.01
Q02788	Collagen alpha-2(VI) chain	186	0.70	<0.01
O88990	Alpha-actinin-3	310	0.69	<0.01
P28654	Decorin	1379	0.69	<0.01
Q60605	Myosin light polypeptide 6	354	0.69	<0.01
P15331	Peripherin	749	0.67	<0.01
P28653	Biglycan	176	0.66	<0.01
P97457	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	13932	0.66	<0.01
Q5XKE0	Myosin-binding protein C_ fast-type	99	0.66	<0.01
Q6IFZ6	Keratin_ type II cytoskeletal 1b	1071	0.66	<0.01
Q922U2	Keratin_ type II cytoskeletal 5	2660	0.65	<0.01
P70696	Histone H2B type 1-A	1904	0.64	<0.01
P62984	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	3709	0.63	<0.01
Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein	175	0.63	<0.01

Q8VCL2	Protein SCO2 homolog_ mitochondrial	67	0.61	0.02
P50446	Keratin_ type II cytoskeletal 6A	1259	0.61	<0.01
Q9Z331	Keratin_ type II cytoskeletal 6B	1259	0.61	<0.01
Q6NXH9	Keratin_ type II cytoskeletal 73	483	0.61	<0.01
P21107	Tropomyosin alpha-3 chain	1041	0.61	<0.01
P02535	Keratin_ type I cytoskeletal 10	11299	0.60	<0.01
Q64475	Histone H2B type 1-B	3263	0.59	<0.01
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	3263	0.59	<0.01
Q9D2U9	Histone H2B type 3-A	3221	0.59	<0.01
Q8CGP0	Histone H2B type 3-B	3221	0.59	<0.01
Q8BGZ7	Keratin_ type II cytoskeletal 75	1060	0.59	<0.01
P51885	Lumican	1063	0.59	<0.01
Q62507	Cochlin	217	0.59	<0.01
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	3263	0.59	<0.01
Q64478	Histone H2B type 1-H	3263	0.59	<0.01
P10854	Histone H2B type 1-M	3263	0.59	<0.01
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	3263	0.59	<0.01
Q64525	Histone H2B type 2-B	3263	0.59	<0.01
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	3263	0.58	<0.01
Q64524	Histone H2B type 2-E	3221	0.58	<0.01
Q99M73	Keratin_ type II cuticular Hb4	321	0.58	<0.01
Q61781	Keratin_ type I cytoskeletal 14	2702	0.58	<0.01
Q61414	Keratin_ type I cytoskeletal 15	1948	0.58	<0.01
Q9R0H5	Keratin_ type II cytoskeletal 71	426	0.58	<0.01
Q6IFZ9	Keratin_ type II cytoskeletal 74	426	0.58	<0.01
Q9CPX6	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	100	0.58	<0.01
P08730	Keratin_ type I cytoskeletal 13	300	0.57	<0.01
Q9Z2K1	Keratin_ type I cytoskeletal 16	957	0.57	<0.01
P11679	Keratin_ type II cytoskeletal 8	422	0.57	<0.01
Q6IFX2	Keratin_ type I cytoskeletal 42	1288	0.57	<0.01

P19001	Keratin_ type I cytoskeletal 19	1288	0.56	<0.01
A1L317	Keratin_ type I cytoskeletal 24	329	0.56	<0.01
P07310	Creatine kinase M-type	5682	0.55	<0.01
B1AQ75	Keratin_ type I cuticular Ha6	1152	0.55	<0.01
Q9QWL7	Keratin_ type I cytoskeletal 17	1480	0.55	<0.01
Q9Z320	Keratin_ type I cytoskeletal 27	574	0.55	<0.01
P09542	Myosin light chain 3	1240	0.55	<0.01
Q8VCW2	Keratin_ type I cytoskeletal 25	574	0.55	<0.01
Q6RHW0	Keratin_ type I cytoskeletal 9	125	0.54	<0.01
P07744	Keratin_ type II cytoskeletal 4	197	0.54	<0.01
P50608	Fibromodulin	2506	0.53	<0.01
A6BLY7	Keratin_ type I cytoskeletal 28	218	0.53	<0.01
P05784	Keratin_ type I cytoskeletal 18	218	0.53	<0.01
Q3UV17	Keratin_ type II cytoskeletal 2 oral	197	0.52	<0.01
Q62168	Keratin_ type I cuticular Ha2	218	0.51	<0.01
P62806	**Histone H4**	**3378**	**0.50**	**<0.01**
Q99M74	**Keratin_ type II cuticular Hb2**	**95**	**0.49**	**<0.01**
Q9DCV7	**Keratin_ type II cytoskeletal 7**	**223**	**0.49**	**<0.01**
P32848	**Parvalbumin alpha**	**10039**	**0.47**	**<0.01**
P06467	**Hemoglobin subunit zeta**	**63**	**0.46**	**<0.01**
Q497I4	**Keratin_ type I cuticular Ha5**	**510**	**0.45**	**<0.01**
Q8BVL3	**Sorting nexin-17**	**148**	**0.44**	**<0.01**
Q8VED5	**Keratin_ type II cytoskeletal 79**	**179**	**0.43**	**<0.01**
Q9ERE2	**Keratin_ type II cuticular Hb1**	**2810**	**0.42**	**<0.01**
P97861	**Keratin_ type II cuticular Hb6**	**2810**	**0.42**	**<0.01**
Q6IMF0	**Keratin_ type II cuticular 87**	**2283**	**0.42**	**<0.01**
Q9Z2T6	**Keratin_ type II cuticular Hb5**	**2125**	**0.42**	**<0.01**
Q9D646	**Keratin_ type I cuticular Ha4**	**3411**	**0.40**	**<0.01**
Q6IME9	**Keratin_ type II cytoskeletal 72**	**140**	**0.40**	**<0.01**
P68433	**Histone H3.1**	**355**	**0.39**	**<0.01**

P84244	**Histone H3.3**	**355**	**0.39**	**<0.01**
P02301	**Histone H3.3C**	**355**	**0.39**	**<0.01**
P84228	**Histone H3.2**	**355**	**0.38**	**<0.01**
Q8K0Y2	**Keratin_ type I cuticular Ha3-I**	**3667**	**0.36**	**<0.01**
Q61765	**Keratin_ type I cuticular Ha1**	**3733**	**0.32**	**<0.01**
Q61897	**Keratin_ type I cuticular Ha3-II**	**3617**	**0.30**	**<0.01**
Q6IFX3	**Keratin_ type I cytoskeletal 40**	**472**	**0.30**	**<0.01**
Q9DCT1	1_5-anhydro-D-fructose reductase	125	KO CAIA*	-
O35348	Acetylcholinesterase collagenic tail peptide	59	KO CAIA*	-
P31786	Acyl-CoA-binding protein	486	KO CAIA*	-
Q920A7	AFG3-like protein 1	66	KO CAIA*	-
Q8JZQ2	AFG3-like protein 2	109	KO CAIA*	-
Q11131	Alpha-(1_3)-fucosyltransferase 7	93	KO CAIA*	-
O88327	Alpha-catulin	56	KO CAIA*	-
P23927	Alpha-crystallin B chain	687	KO CAIA*	-
O35608	Angiopoietin-2	76	KO CAIA*	-
O35643	AP-1 complex subunit beta-1	54	KO CAIA*	-
Q9QWY8	Arf-GAP with SH3 domain_ ANK repeat and PH domain-containing protein 1	53	KO CAIA*	-
Q91WU5	Arsenite methyltransferase	52	KO CAIA*	-
Q9DCX2	ATP synthase subunit d_ mitochondrial	132	KO CAIA*	-
P97450	ATP synthase-coupling factor 6_ mitochondrial	512	KO CAIA*	-
O54724	Caveolae-associated protein 1	85	KO CAIA*	-
Q8BHB9	Chloride intracellular channel protein 6	63	KO CAIA*	-
Q5SPX1	Coiled-coil domain-containing protein 157	79	KO CAIA*	-
Q5SV66	Coiled-coil domain-containing protein 42	82	KO CAIA*	-
Q8CCK0	Core histone macro-H2A.2	71	KO CAIA*	-
P43135	COUP transcription factor 2	66	KO CAIA*	-
O35451	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta	45	KO CAIA*	-
P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial	1472	KO CAIA*	-
Q9D816	Cytochrome P450 2C55	120	KO CAIA*	-

P97427	Dihydropyrimidinase-related protein 1	84	KO CAIA*	-
Q64237	Dopamine beta-hydroxylase	99	KO CAIA*	-
Q8R180	ERO1-like protein alpha	93	KO CAIA*	-
Q9D7E3	Esterase OVCA2	169	KO CAIA*	-
Q8BGD9	Eukaryotic translation initiation factor 4B	108	KO CAIA*	-
P47757	F-actin-capping protein subunit beta	204	KO CAIA*	-
P04117	Fatty acid-binding protein_ adipocyte	912	KO CAIA*	-
Q9R1K5	Fizzy-related protein homolog	61	KO CAIA*	-
P03995	Glial fibrillary acidic protein	56	KO CAIA*	-
Q60934	Glutamate receptor ionotropic_ kainate 1	59	KO CAIA*	-
P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	73	KO CAIA*	-
P15626	Glutathione S-transferase Mu 2	47	KO CAIA*	-
Q8R5I6	Glutathione S-transferase Mu 4	47	KO CAIA*	-
P48774	Glutathione S-transferase Mu 5	47	KO CAIA*	-
Q80W21	Glutathione S-transferase Mu 7	47	KO CAIA*	-
Q61586	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1_ mitochondrial	75	KO CAIA*	-
Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial	56	KO CAIA*	-
Q91X72	Hemopexin	148	KO CAIA*	-
O08983	Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein homolog	64	KO CAIA*	-
Q9CYC5	Kinetochore-associated protein DSN1 homolog	62	KO CAIA*	-
P08071	Lactotransferrin	71	KO CAIA*	-
Q8BLY3	Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 3	54	KO CAIA*	-
P26041	Moesin	63	KO CAIA*	-
O08747	Netrin receptor UNC5C	60	KO CAIA*	-
Q8BLF1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	59	KO CAIA*	-
P40935	Phenylethanolamine N-methyltransferase	168	KO CAIA*	-
P09041	Phosphoglycerate kinase 2	45	KO CAIA*	-
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	112	KO CAIA*	-
Q61233	Plastin-2	72	KO CAIA*	-
Q9JIY0	Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	56	KO CAIA*	-

Q9QXS1	Plectin	53	KO CAIA*	-
Q7TT15	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 17	72	KO CAIA*	-
O35955	Proteasome subunit beta type-10	95	KO CAIA*	-
Q8K1C0	Protein angel homolog 2	162	KO CAIA*	-
Q8BR07	Protein bicaudal D homolog 1	82	KO CAIA*	-
Q8CC96	Protein BNIP5	66	KO CAIA*	-
P09103	Protein disulfide-isomerase	72	KO CAIA*	-
Q8BG67	Protein EFR3 homolog A	91	KO CAIA*	-
Q8VE88	Protein FAM114A2	71	KO CAIA*	-
Q2EMV9	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP14	60	KO CAIA*	-
P01101	Proto-oncogene c-Fos	79	KO CAIA*	-
P28705	Retinoic acid receptor RXR-gamma	59	KO CAIA*	-
Q9CPR1	RWD domain-containing protein 4	84	KO CAIA*	-
P15508	Spectrin beta chain_ erythrocytic	55	KO CAIA*	-
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	198	KO CAIA*	-
Q6QNU9	Toll-like receptor 12	54	KO CAIA*	-
Q8BKT2	Transcription factor HES-7	181	KO CAIA*	-
Q91YL3	Uridine-cytidine kinase-like 1	62	KO CAIA*	-
Q8BH47	Vesicle-trafficking protein SEC22a	102	KO CAIA*	-
O09053	Werner syndrome ATP-dependent helicase homolog	77	KO CAIA*	-
Q6NS86	Zinc finger protein 366	79	KO CAIA*	-
Q8BJY1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	67	KO C*	-
Q91ZV4	2-acylglycerol O-acyltransferase 1	131	KO C*	-
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	1328	KO C*	-
Q9CQJ0	Acyl-coenzyme A thioesterase THEM5	115	KO C*	-
Q9DBR4	Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family B member 2	56	KO C*	-
Q3V0J4	Ankyrin repeat domain-containing protein 53	72	KO C*	-
Q8BZW2	Ankyrin repeat domain-containing protein SOWAHB	46	KO C*	-
P48036	Annexin A5	57	KO C*	-
Q3UHD9	Arf-GAP with GTPase_ ANK repeat and PH domain-containing protein 2	72	KO C*	-

Q8BIP0	Aspartate--tRNA ligase_ mitochondrial	55	KO C*	-
P70408	Cadherin-10	74	KO C*	-
Q9CZM9	Calcium-activated potassium channel subunit beta-2	139	KO C*	-
Q9JM83	Calmodulin-4	288	KO C*	-
Q9D6P8	Calmodulin-like protein 3	76	KO C*	-
Q640L3	Cell cycle progression protein 1	45	KO C*	-
Q8CDI6	Coiled-coil domain-containing protein 158	74	KO C*	-
Q8BVF4	Coiled-coil domain-containing protein 30	54	KO C*	-
P21180	Complement C2	47	KO C*	-
Q8VCG4	Complement component C8 gamma chain	121	KO C*	-
Q80YP0	Cyclin-dependent kinase 3	85	KO C*	-
Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1_ mitochondrial	30	KO C*	-
Q62425	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	515	KO C*	-
P56656	Cytochrome P450 2C39	70	KO C*	-
Q9QZZ6	Dermatopontin	207	KO C*	-
P97310	DNA replication licensing factor MCM2	94	KO C*	-
Q9QYI3	DnaJ homolog subfamily C member 7	60	KO C*	-
Q05816	Fatty acid-binding protein 5	97	KO C*	-
Q8BH60	Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein	59	KO C*	-
Q91VW5	Golgin subfamily A member 4	44	KO C*	-
Q80V72	Inositol hexakisphosphate kinase 2	122	KO C*	-
Q5SF07	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	62	KO C*	-
Q9D783	Kelch-like protein 40	65	KO C*	-
Q9D312	Keratin_ type I cytoskeletal 20	66	KO C*	-
O35367	Keratocan	163	KO C*	-
Q9R190	Metastasis-associated protein MTA2	58	KO C*	-
B1AYB6	Methyl-CpG-binding domain protein 5	45	KO C*	-
Q62000	Mimecan	111	KO C*	-
Q91W39	Nuclear receptor coactivator 5	70	KO C*	-
Q8R4R6	Nucleoporin NUP35	67	KO C*	-

Q9Z1M0	P2X purinoceptor 7	72	KO C*	-
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	706	KO C*	-
Q3UY34	Protein CUSTOS	94	KO C*	-
P27773	Protein disulfide-isomerase A3	53	KO C*	-
P14069	Protein S100-A6	713	KO C*	-
Q9JL25	Regulator of G-protein signaling 1	50	KO C*	-
Q91YM2	Rho GTPase-activating protein 35	168	KO C*	-
O35130	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	93	KO C*	-
Q8K031	StAR-related lipid transfer protein 8	79	KO C*	-
O88935	Synapsin-1	54	KO C*	-
O54887	Testis-specific serine kinase substrate	71	KO C*	-
Q3U1V6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3	57	KO C*	-
Q80U95	Ubiquitin-protein ligase E3C	44	KO C*	-
Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	187	KO C*	-
O54927	WD repeat and SOCS box-containing protein 1	57	KO C*	-
Q8CDC7	Zinc finger and BTB domain-containing protein 9	71	KO C*	-
Q8CCG1	Zinc finger C2HC domain-containing protein 1C	58	KO C*	-
Q62158	Zinc finger protein RFP	111	KO C*	-

°Identificação baseada no ID das proteínas do banco de dados *Uniprot Database* (http://wwwwww.uniprot.org/).

+Proteínas com expressão significativamente alterada estão organizadas de acordo com a razão.

A expressão diferencial entre os grupos foi expressa em $p < 0.05$. Proteínas destacadas em negrito encontram-se aumentadas ou diminuídas mais que 2 vezes.

* Proteínas únicas de cada grupo, dentro dessa comparação.

Tabela 5. Proteínas com expressão significativamente alteradas no grupo KO CAIA em comparação com o grupo WT CAIA, ambos com artrite reumatoide induzida.

°Access Number	Protein Name	*PLGS* Score	+Ratio KO CAIA:WT CAIA	*P*
Q920A7	**AFG3-like protein 1**	**71**	**3.29**	**<0.01**
P97366	**Ecotropic viral integration site 5 protein**	**100**	**3.29**	**<0.01**
Q3TTY5	**Keratin_ type II cytoskeletal 2 epidermal**	**205**	**2.83**	**<0.01**
P04247	**Myoglobin**	**230**	**2.77**	**<0.01**
Q9QZ47	**Troponin T_ fast skeletal muscle**	**52**	**2.27**	**<0.01**
Q62168	**Keratin_ type I cuticular Ha2**	**185**	**2.23**	**<0.01**
A1L317	**Keratin_ type I cytoskeletal 24**	**185**	**2.23**	**<0.01**
P07744	**Keratin_ type II cytoskeletal 4**	**44**	**2.23**	**<0.01**
P02535	**Keratin_ type I cytoskeletal 10**	**124**	**2.20**	**<0.01**
P05784	**Keratin_ type I cytoskeletal 18**	**185**	**2.20**	**<0.01**
A6BLY7	**Keratin_ type I cytoskeletal 28**	**185**	**2.20**	**<0.01**
Q3UV17	**Keratin_ type II cytoskeletal 2 oral**	**44**	**2.20**	**<0.01**
Q99KI0	**Aconitate hydratase_ mitochondrial**	**62**	**2.18**	**<0.01**
Q8BGZ7	**Keratin_ type II cytoskeletal 75**	**472**	**2.10**	**<0.01**
Q9Z2K1	**Keratin_ type I cytoskeletal 16**	**352**	**2.08**	**<0.01**
Q8VCW2	**Keratin_ type I cytoskeletal 25**	**167**	**2.08**	**<0.01**
P50446	**Keratin_ type II cytoskeletal 6A**	**476**	**2.08**	**<0.01**
Q9Z331	**Keratin_ type II cytoskeletal 6B**	**472**	**2.05**	**<0.01**
Q61414	**Keratin_ type I cytoskeletal 15**	**530**	**2.01**	**<0.01**
P19001	**Keratin_ type I cytoskeletal 19**	**397**	**2.01**	**<0.01**
Q6IFX2	**Keratin_ type I cytoskeletal 42**	**362**	**2.01**	**<0.01**
Q61781	Keratin_ type I cytoskeletal 14	597	1.99	<0.01
Q9QWL7	Keratin_ type I cytoskeletal 17	412	1.95	<0.01
Q61897	Keratin_ type I cuticular Ha3-II	430	1.90	<0.01
Q60847	Collagen alpha-1(XII) chain	49	1.86	<0.01
P07356	Annexin A2	121	1.80	<0.01
P04104	Keratin_ type II cytoskeletal 1	276	1.79	<0.01

Q9DCV7	Keratin_ type II cytoskeletal 7	46	1.79	<0.01
Q6NXH9	Keratin_ type II cytoskeletal 73	85	1.77	<0.01
Q99M73	Keratin_ type II cuticular Hb4	62	1.73	<0.01
Q6IFZ6	Keratin_ type II cytoskeletal 1b	183	1.73	<0.01
P05201	Aspartate aminotransferase_ cytoplasmic	74	1.72	<0.01
P28654	Decorin	910	1.72	<0.01
P15331	Peripherin	56	1.68	<0.01
Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain	86	1.63	<0.01
Q6IME9	Keratin_ type II cytoskeletal 72	54	1.63	<0.01
P11679	Keratin_ type II cytoskeletal 8	87	1.63	<0.01
P08249	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	1037	1.62	<0.01
P28650	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	85	1.57	0.02
Q9R0H5	Keratin_ type II cytoskeletal 71	74	1.54	<0.01
Q6IFZ9	Keratin_ type II cytoskeletal 74	74	1.54	<0.01
P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	128	1.52	<0.01
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	396	1.51	0.04
Q8VED5	Keratin_ type II cytoskeletal 79	50	1.49	<0.01
Q8CI43	Myosin light chain 6B	160	1.48	<0.01
P14152	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	410	1.45	<0.01
Q3USB7	Inactive phospholipase C-like protein 1	234	1.45	0.02
Q02788	Collagen alpha-2(VI) chain	102	1.43	<0.01
P20801	Troponin C_ skeletal muscle	376	1.42	<0.01
Q61879	Myosin-10	51	1.39	0.04
P31001	Desmin	84	1.38	<0.01
Q9JK37	Myozenin-1	85	1.38	<0.01
P56480	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	935	1.36	<0.01
P08553	Neurofilament medium polypeptide	189	1.36	<0.01
Q9JI91	Alpha-actinin-2	454	1.35	<0.01
P19246	Neurofilament heavy polypeptide	201	1.35	<0.01
P46660	Alpha-internexin	189	1.34	<0.01

P02088	Hemoglobin subunit beta-1	10342	1.34	<0.01
P08551	Neurofilament light polypeptide	189	1.34	<0.01
P06745	Glucose-6-phosphate isomerase	69	1.34	0.01
Q8VDD5	Myosin-9	64	1.34	0.01
C0HKE6	Histone H2A type 1-I	4167	1.32	<0.01
Q62234	Myomesin-1	67	1.32	0.01
P97447	Four and a half LIM domains protein 1	163	1.31	<0.01
Q03265	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial	556	1.30	<0.01
P23927	Alpha-crystallin B chain	115	1.30	0.03
Q9ET01	Glycogen phosphorylase_ liver form	32	1.28	<0.01
Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	224	1.28	<0.01
Q922F4	Tubulin beta-6 chain	204	1.28	<0.01
Q8CI94	Glycogen phosphorylase_ brain form	67	1.27	<0.01
P68372	Tubulin beta-4B chain	296	1.27	<0.01
Q9D646	Keratin_ type I cuticular Ha4	239	1.26	<0.01
Q497I4	Keratin_ type I cuticular Ha5	231	1.26	<0.01
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	402	1.26	<0.01
Q99LX0	Parkinson disease protein 7 homolog	481	1.25	<0.01
O09165	Calsequestrin-1	1040	1.23	<0.01
Q5SX40	Myosin-1	8073	1.23	<0.01
P13542	Myosin-8	6831	1.23	<0.01
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase_ muscle form	351	1.22	<0.01
P13541	Myosin-3	3059	1.22	<0.01
Q5SX39	Myosin-4	9491	1.22	<0.01
Q02566	Myosin-6	3247	1.22	<0.01
Q91Z83	Myosin-7	3328	1.22	<0.01
Q6IFX3	Keratin_ type I cytoskeletal 40	241	1.22	0.02
P50608	Fibromodulin	95	1.20	<0.01
Q64467	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific	3147	1.20	<0.01
P97457	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	13422	1.20	<0.01

Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	411	1.20	<0.01
P99024	Tubulin beta-5 chain	500	1.20	<0.01
P05213	Tubulin alpha-1B chain	169	1.20	0.01
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	97	1.19	<0.01
Q61765	Keratin_ type I cuticular Ha1	424	1.19	<0.01
Q8K0Y2	Keratin_ type I cuticular Ha3-I	239	1.19	<0.01
Q9JK53	Prolargin	748	1.19	<0.01
P97861	Keratin_ type II cuticular Hb6	78	1.17	<0.01
Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	411	1.17	<0.01
P05214	Tubulin alpha-3 chain	132	1.17	0.01
P20152	Vimentin	586	1.16	<0.01
P68369	Tubulin alpha-1A chain	169	1.16	0.04
P15532	Nucleoside diphosphate kinase A	494	1.15	0.04
Q99MQ4	Asporin	363	1.14	<0.01
A2AQP0	Myosin-7B	915	1.14	<0.01
Q6IMF0	Keratin_ type II cuticular 87	70	1.14	0.04
P52480	Pyruvate kinase PKM	1902	1.13	<0.01
P17751	Triosephosphate isomerase	952	1.13	<0.01
Q7TQ48	Sarcalumenin	107	1.11	0.03
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	4648	1.08	<0.01
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	4378	1.08	<0.01
P63268	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	18028	0.98	0.01
P68033	Actin_ alpha cardiac muscle 1	18718	0.98	<0.01
P62737	Actin_ aortic smooth muscle	18718	0.98	<0.01
P60710	Actin_ cytoplasmic 1	12571	0.97	0.01
P63260	Actin_ cytoplasmic 2	12571	0.97	<0.01
P02104	Hemoglobin subunit epsilon-Y2	1291	0.95	0.01
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	3210	0.95	<0.01
P16015	Carbonic anhydrase 3	1362	0.94	<0.01
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	866	0.93	0.03

P21550	Beta-enolase	3266	0.93	<0.01
P58774	Tropomyosin beta chain	10859	0.92	<0.01
P51885	Lumican OS=Mus musculus	336	0.91	<0.01
Q6GSS7	Histone H2A type 2-A	4167	0.86	<0.01
Q8R1M2	Histone H2A.J	4167	0.85	<0.01
P0CG49	Polyubiquitin-B	1568	0.83	<0.01
P62984	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	1568	0.83	<0.01
P0CG50	Polyubiquitin-C	1568	0.81	<0.01
P62983	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	1568	0.81	<0.01
O88990	Alpha-actinin-3	413	0.80	<0.01
P20029	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	166	0.80	<0.01
O55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	139	0.79	0.01
Q8R429	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	286	0.79	<0.01
P07310	Creatine kinase M-type	10133	0.77	<0.01
P68433	Histone H3.1	237	0.75	0.04
P28653	Biglycan	94	0.75	0.01
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	297	0.75	<0.01
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	10213	0.74	<0.01
P02301	Histone H3.3C	237	0.73	0.04
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	275	0.73	<0.01
Q00897	Alpha-1-antitrypsin 1-4	275	0.73	<0.01
P62806	Histone H4	1736	0.73	<0.01
Q00896	Alpha-1-antitrypsin 1-3	275	0.73	<0.01
P05977	Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform	8681	0.72	<0.01
P09542	Myosin light chain 3	1173	0.66	<0.01
P07724	Albumin	3419	0.60	<0.01
Q921I1	Serotransferrin	502	0.55	<0.01
O08807	**Peroxiredoxin-4**	**230**	**0.51**	**<0.01**
Q91X72	**Hemopexin**	**91**	**0.49**	**<0.01**
P35700	**Peroxiredoxin-1**	**243**	**0.48**	**<0.01**

P21107	**Tropomyosin alpha-3 chain**	**2053**	**0.46**	**<0.01**
P32848	**Parvalbumin alpha**	**12358**	**0.42**	**<0.01**
P06467	**Hemoglobin subunit zeta**	**159**	**0.35**	**<0.01**
Q9DCT1	1_5-anhydro-D-fructose reductase	125	KO CAIA*	-
O35348	Acetylcholinesterase collagenic tail peptide	59	KO CAIA*	-
Q8JZQ2	AFG3-like protein 2	109	KO CAIA*	-
Q11131	Alpha-(1_3)-fucosyltransferase 7	93	KO CAIA*	-
O88327	Alpha-catulin	56	KO CAIA*	-
O35608	Angiopoietin-2	76	KO CAIA*	-
O35643	AP-1 complex subunit beta-1	54	KO CAIA*	-
Q9QWY8	Arf-GAP with SH3 domain_ ANK repeat and PH domain-containing protein 1	53	KO CAIA*	-
Q9D0I9	Arginine--tRNA ligase_ cytoplasmic	63	KO CAIA*	-
Q91WU5	Arsenite methyltransferase	52	KO CAIA*	-
P05202	Aspartate aminotransferase_ mitochondrial	138	KO CAIA*	-
Q9DCX2	ATP synthase subunit d_ mitochondrial	132	KO CAIA*	-
Q9DB20	ATP synthase subunit O_ mitochondrial	324	KO CAIA*	-
P97450	ATP synthase-coupling factor 6_ mitochondrial	512	KO CAIA*	-
Q8BH59	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	203	KO CAIA*	-
Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein	78	KO CAIA*	-
O54724	Caveolae-associated protein 1	85	KO CAIA*	-
Q8BHB9	Chloride intracellular channel protein 6	63	KO CAIA*	-
Q9CZU6	Citrate synthase_ mitochondrial	75	KO CAIA*	-
Q62507	Cochlin	249	KO CAIA*	-
Q5SPX1	Coiled-coil domain-containing protein 157	79	KO CAIA*	-
Q5SV66	Coiled-coil domain-containing protein 42	82	KO CAIA*	-
Q8CCK0	Core histone macro-H2A.2	71	KO CAIA*	-
P43135	COUP transcription factor 2	66	KO CAIA*	-
Q6P8J7	Creatine kinase S-type_ mitochondrial	215	KO CAIA*	-
O35451	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta	45	KO CAIA*	-
P19783	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial	136	KO CAIA*	-

P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial	1472	KO CAIA*	-
P62897	Cytochrome c_ somatic	298	KO CAIA*	-
Q9D816	Cytochrome P450 2C55	120	KO CAIA*	-
P97427	Dihydropyrimidinase-related protein 1	84	KO CAIA*	-
Q64237	Dopamine beta-hydroxylase	99	KO CAIA*	-
Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha_ mitochondrial	164	KO CAIA*	-
Q8R180	ERO1-like protein alpha	93	KO CAIA*	-
Q9D7E3	Esterase OVCA2	169	KO CAIA*	-
Q8BGD9	Eukaryotic translation initiation factor 4B	108	KO CAIA*	-
P47757	F-actin-capping protein subunit beta	204	KO CAIA*	-
Q9R1K5	Fizzy-related protein homolog	61	KO CAIA*	-
O54974	Galectin-7	483	KO CAIA*	-
P03995	Glial fibrillary acidic protein	56	KO CAIA*	-
Q60934	Glutamate receptor ionotropic_ kainate 1	59	KO CAIA*	-
P46412	Glutathione peroxidase 3	402	KO CAIA*	-
P15626	Glutathione S-transferase Mu 2	47	KO CAIA*	-
Q8R5I6	Glutathione S-transferase Mu 4	47	KO CAIA*	-
P48774	Glutathione S-transferase Mu 5	47	KO CAIA*	-
Q80W21	Glutathione S-transferase Mu 7	47	KO CAIA*	-
Q61586	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1_ mitochondrial	75	KO CAIA*	-
P14602	Heat shock protein beta-1	434	KO CAIA*	-
O08983	Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein homolog	64	KO CAIA*	-
A2AUC9	Kelch-like protein 41	53	KO CAIA*	-
Q6RHW0	Keratin_ type I cytoskeletal 9	48	KO CAIA*	-
Q99M74	Keratin_ type II cuticular Hb2	64	KO CAIA*	-
Q9CYC5	Kinetochore-associated protein DSN1 homolog	62	KO CAIA*	-
P08071	Lactotransferrin	71	KO CAIA*	-
Q8BLY3	Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 3	54	KO CAIA*	-
P23949	mRNA decay activator protein ZFP36L2	137	KO CAIA*	-
O08747	Netrin receptor UNC5C	60	KO CAIA*	-

Q8BLF1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	59	KO CAIA*	-
Q9D6J4	N-terminal EF-hand calcium-binding protein 3	113	KO CAIA*	-
Q9JIK5	Nucleolar RNA helicase 2	54	KO CAIA*	-
P40935	Phenylethanolamine N-methyltransferase	168	KO CAIA*	-
Q9JIY0	Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	56	KO CAIA*	-
Q9QXS1	Plectin	53	KO CAIA*	-
Q7TT15	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 17	72	KO CAIA*	-
O35955	Proteasome subunit beta type-10	95	KO CAIA*	-
Q8K1C0	Protein angel homolog 2	162	KO CAIA*	-
Q8BR07	Protein bicaudal D homolog 1	82	KO CAIA*	-
Q8CC96	Protein BNIP5	66	KO CAIA*	-
P09103	Protein disulfide-isomerase	72	KO CAIA*	-
Q8BG67	Protein EFR3 homolog A	91	KO CAIA*	-
Q8VE88	Protein FAM114A2	71	KO CAIA*	-
Q2EMV9	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP14	60	KO CAIA*	-
Q8VCL2	Protein SCO2 homolog_ mitochondrial	58	KO CAIA*	-
P01101	Proto-oncogene c-Fos	79	KO CAIA*	-
P28705	Retinoic acid receptor RXR-gamma	59	KO CAIA*	-
Q9CPR1	RWD domain-containing protein 4	84	KO CAIA*	-
Q8BVL3	Sorting nexin-17	80	KO CAIA*	-
P15508	Spectrin beta chain_ erythrocytic	55	KO CAIA*	-
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	198	KO CAIA*	-
Q6X6Z7	Tektin-3	82	KO CAIA*	-
Q9Z1T2	Thrombospondin-4	68	KO CAIA*	-
Q6QNU9	Toll-like receptor 12	54	KO CAIA*	-
Q8BKT2	Transcription factor HES-7	181	KO CAIA*	-
Q24JP4	Uncharacterized protein C5orf47 homolog	164	KO CAIA*	-
Q91YL3	Uridine-cytidine kinase-like 1	62	KO CAIA*	-
Q8BH47	Vesicle-trafficking protein SEC22a	102	KO CAIA*	-
Q6NS86	Zinc finger protein 366	79	KO CAIA*	-

P14869	60S acidic ribosomal protein P0	127	WT CAIA*	-
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	395	WT CAIA*	-
Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5	63	WT CAIA*	-
A2AS55	Ankyrin repeat domain-containing protein 16	91	WT CAIA*	-
P10107	Annexin A1	121	WT CAIA*	-
Q00623	Apolipoprotein A-I	585	WT CAIA*	-
P06728	Apolipoprotein A-IV	134	WT CAIA*	-
Q8K2H4	Arf-GAP with coiled-coil_ ANK repeat and PH domain-containing protein 1	52	WT CAIA*	-
Q922B2	Aspartate--tRNA ligase_ cytoplasmic	49	WT CAIA*	-
Q9DC29	ATP-binding cassette sub-family B member 6_ mitochondrial	109	WT CAIA*	-
Q9JKL5	Calcineurin B homologous protein 3	73	WT CAIA*	-
Q9D6P8	Calmodulin-like protein 3	38	WT CAIA*	-
Q99KF0	Caspase recruitment domain-containing protein 14	54	WT CAIA*	-
Q640L3	Cell cycle progression protein 1	61	WT CAIA*	-
Q6A078	Centrosomal protein of 290 kDa	40	WT CAIA*	-
O35744	Chitinase-like protein 3	354	WT CAIA*	-
Q91Z98	Chitinase-like protein 4	84	WT CAIA*	-
P01027	Complement C3	87	WT CAIA*	-
Q8JZW4	Copine-5	68	WT CAIA*	-
Q9DC53	Copine-8	37	WT CAIA*	-
Q1RLL3	Copine-9	37	WT CAIA*	-
Q8K3G9	DCC-interacting protein 13-beta	66	WT CAIA*	-
Q7M6Y5	Deuterosome assembly protein 1	58	WT CAIA*	-
Q9DBT9	Dimethylglycine dehydrogenase_ mitochondrial	37	WT CAIA*	-
P35761	Dual specificity protein kinase TTK	49	WT CAIA*	-
P58252	Elongation factor 2	49	WT CAIA*	-
Q91VC3	Eukaryotic initiation factor 4A-III	95	WT CAIA*	-
P47754	F-actin-capping protein subunit alpha-2	76	WT CAIA*	-
Q9CPU7	F-box only protein 32	58	WT CAIA*	-
E9PV24	Fibrinogen alpha chain	75	WT CAIA*	-

Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain	214	WT CAIA*	-
P11276	Fibronectin	110	WT CAIA*	-
Q3TFK5	G patch domain-containing protein 4	69	WT CAIA*	-
P16045	Galectin-1	94	WT CAIA*	-
Q9DCZ1	GMP reductase 1	92	WT CAIA*	-
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	82	WT CAIA*	-
P11499	Heat shock protein HSP 90-beta	127	WT CAIA*	-
Q6PCN7	Helicase-like transcription factor	44	WT CAIA*	-
P01864	Ig gamma-2A chain C region secreted form	206	WT CAIA*	-
P01863	Ig gamma-2A chain C region_ A allele	206	WT CAIA*	-
P01865	Ig gamma-2A chain C region_ membrane-bound form	206	WT CAIA*	-
P01867	Ig gamma-2B chain C region	274	WT CAIA*	-
P03987	Ig gamma-3 chain C region	107	WT CAIA*	-
P01872	Immunoglobulin heavy constant mu	118	WT CAIA*	-
Q9EQS9	Immunoglobulin superfamily DCC subclass member 4	50	WT CAIA*	-
O35345	Importin subunit alpha-7	104	WT CAIA*	-
P15975	Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 53	35	WT CAIA*	-
Q80V72	Inositol hexakisphosphate kinase 2	85	WT CAIA*	-
Q61739	Integrin alpha-6	72	WT CAIA*	-
P70434	Interferon regulatory factor 7	83	WT CAIA*	-
O35368	Interferon-activable protein 203	65	WT CAIA*	-
Q8VCX6	KICSTOR complex protein kaptin	99	WT CAIA*	-
P33175	Kinesin heavy chain isoform 5A	57	WT CAIA*	-
Q52KG5	Kinesin-like protein KIF26A	39	WT CAIA*	-
Q6PB66	Leucine-rich PPR motif-containing protein_ mitochondrial	37	WT CAIA*	-
Q9DB40	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 27	77	WT CAIA*	-
P82343	N-acylglucosamine 2-epimerase	42	WT CAIA*	-
O08692	Neutrophilic granule protein	1130	WT CAIA*	-
Q9R207	Nibrin	46	WT CAIA*	-
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	221	WT CAIA*	-

Q62009	Periostin	104	WT CAIA*	-
Q9D4H9	PHD finger protein 14	53	WT CAIA*	-
Q99K51	Plastin-3	40	WT CAIA*	-
Q61838	Pregnancy zone protein	166	WT CAIA*	-
P14069	Protein S100-A6	433	WT CAIA*	-
P31725	Protein S100-A9	229	WT CAIA*	-
Q9JM99	Proteoglycan 4	38	WT CAIA*	-
P26043	Radixin	48	WT CAIA*	-
Q91YM2	Rho GTPase-activating protein 35	112	WT CAIA*	-
P42208	Septin-2	89	WT CAIA*	-
P29621	Serine protease inhibitor A3C	119	WT CAIA*	-
Q80X76	Serine protease inhibitor A3F	119	WT CAIA*	-
Q5I2A0	Serine protease inhibitor A3G	50	WT CAIA*	-
P07759	Serine protease inhibitor A3K	824	WT CAIA*	-
Q03734	Serine protease inhibitor A3M	119	WT CAIA*	-
Q91WP6	Serine protease inhibitor A3N	50	WT CAIA*	-
Q0VGB7	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2	252	WT CAIA*	-
Q8BQM7	Single-pass membrane and coiled-coil domain-containing protein 3	99	WT CAIA*	-
P58404	Striatin-4	53	WT CAIA*	-
Q9JKT2	Taste receptor type 2 member 119	48	WT CAIA*	-
P10639	Thioredoxin	269	WT CAIA*	-
P15806	Transcription factor E2-alpha	86	WT CAIA*	-
Q8C3X4	Translation factor Guf1_ mitochondrial	42	WT CAIA*	-
Q6IRU2	Tropomyosin alpha-4 chain	264	WT CAIA*	-
Q3UX10	Tubulin alpha chain-like 3	63	WT CAIA*	-
Q5I043	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	61	WT CAIA*	-
Q9D906	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	119	WT CAIA*	-

°Identificação baseada no ID das proteínas do banco de dados *Uniprot Database* (http://wwwwww.uniprot.org/).

+Proteínas com expressão significativamente alterada estão organizadas de acordo com a razão.

A expressão diferencial entre os grupos foi expressa em $p < 0.05$. Proteínas destacadas em negrito encontram-se aumentadas ou diminuídas mais que 2 vezes.

* Proteínas únicas de cada grupo, dentro dessa comparação.

Tabela 6. Proteínas com expressão significativamente alteradas no grupo KO C em comparação ao grupo WT C, ambos grupos controles, sem indução da artrite reumatoide.

°Access Number	Protein Name	*PLGS* Score	+Ratio KO C:WT C	*P*
Q6IFZ6	Keratin_ type II cytoskeletal 1b	52	22.65	<0.01
Q3TTY5	Keratin_ type II cytoskeletal 2 epidermal	69	16.95	<0.01
P02535	Keratin_ type I cytoskeletal 10	87	14.01	<0.01
P50608	Fibromodulin	83	12.81	<0.01
P04104	Keratin_ type II cytoskeletal 1	90	9.58	<0.01
Q64524	Histone H2B type 2-E	137	6.75	<0.01
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	137	6.69	<0.01
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	137	6.69	<0.01
Q8CGP0	Histone H2B type 3-B	137	6.69	<0.01
P70696	Histone H2B type 1-A	137	6.62	<0.01
Q64475	Histone H2B type 1-B	137	6.62	<0.01
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	137	6.62	<0.01
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	137	6.62	<0.01
Q64478	Histone H2B type 1-H	137	6.55	<0.01
P10854	Histone H2B type 1-M	137	6.55	<0.01
Q9D2U9	Histone H2B type 3-A	137	6.55	<0.01
Q64525	Histone H2B type 2-B	137	6.49	<0.01
Q922U2	Keratin_ type II cytoskeletal 5	61	6.05	<0.01
P50446	Keratin_ type II cytoskeletal 6A	61	5.53	<0.01
Q9Z331	Keratin_ type II cytoskeletal 6B	62	5.47	<0.01
Q8BGZ7	Keratin_ type II cytoskeletal 75	61	4.95	<0.01
Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	1119	3.25	<0.01
Q8R1M2	Histone H2A.J	1119	3.16	<0.01
C0HKE9	Histone H2A type 1-P	1119	3.10	<0.01
Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B	149	2.53	<0.01
P15532	Nucleoside diphosphate kinase A	149	2.48	<0.01

P11087	**Collagen alpha-1(I) chain**	**47**	**2.36**	**<0.01**
Q8BVF4	**Coiled-coil domain-containing protein 30**	**23**	**2.29**	**0.04**
Q01149	**Collagen alpha-2(I) chain**	**67**	**2.25**	**<0.01**
P16015	**Carbonic anhydrase 3**	**1699**	**2.23**	**<0.01**
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase_ muscle form	286	1.90	<0.01
Q8CDI6	Coiled-coil domain-containing protein 158	44	1.86	<0.01
Q9JI91	Alpha-actinin-2	137	1.84	<0.01
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	1473	1.82	<0.01
P06467	Hemoglobin subunit zeta	138	1.73	<0.01
P05201	Aspartate aminotransferase_ cytoplasmic	82	1.72	<0.01
P02104	Hemoglobin subunit epsilon-Y2	327	1.70	<0.01
C0HKE2	Histone H2A type 1-C	1119	1.68	<0.01
Q64523	Histone H2A type 2-C	1119	1.68	<0.01
C0HKE1	Histone H2A type 1-B	1119	1.67	<0.01
Q8CGP6	Histone H2A type 1-H	1119	1.67	<0.01
C0HKE6	Histone H2A type 1-I	1119	1.67	<0.01
C0HKE7	Histone H2A type 1-N	1119	1.67	<0.01
P08553	Neurofilament medium polypeptide	58	1.67	<0.01
C0HKE3	Histone H2A type 1-D	1119	1.65	<0.01
C0HKE4	Histone H2A type 1-E	1119	1.65	<0.01
C0HKE8	Histone H2A type 1-O	1119	1.65	<0.01
Q6GSS7	Histone H2A type 2-A	1119	1.65	<0.01
Q8BFU2	Histone H2A type 3	1119	1.65	<0.01
P08551	Neurofilament light polypeptide	51	1.65	<0.01
C0HKE5	Histone H2A type 1-G	1119	1.63	<0.01
Q5SX40	Myosin-1	6403	1.63	<0.01
P46660	Alpha-internexin	51	1.62	<0.01
P31001	Desmin	97	1.62	<0.01
P13542	Myosin-8	6280	1.62	<0.01
Q8CGP7	Histone H2A type 1-K	1119	1.60	<0.01

P19246	Neurofilament heavy polypeptide	51	1.60	<0.01
Q91Z83	Myosin-7	2683	1.58	<0.01
P56480	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	710	1.57	<0.01
Q02566	Myosin-6	2638	1.57	<0.01
P07724	Albumin	1274	1.55	<0.01
P08249	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	241	1.55	<0.01
P13541	Myosin-3	2669	1.55	<0.01
Q5SX39	Myosin-4	8788	1.55	<0.01
Q7TPR4	Alpha-actinin-1	13	1.55	0.01
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	107	1.54	<0.01
O88990	Alpha-actinin-3	412	1.52	<0.01
A2AQP0	Myosin-7B	1109	1.52	<0.01
P60710	Actin_ cytoplasmic 1	7117	1.51	<0.01
P63260	Actin_ cytoplasmic 2	7117	1.51	<0.01
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	3638	1.51	<0.01
Q7TQ48	Sarcalumenin	67	1.49	<0.01
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	45	1.49	0.01
P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	217	1.46	0.01
Q61879	Myosin-10	17	1.46	0.01
Q99KI0	Aconitate hydratase_ mitochondrial	68	1.45	<0.01
P68033	Actin_ alpha cardiac muscle 1	14275	1.45	<0.01
P68134	Actin_ alpha skeletal muscle	18530	1.45	<0.01
P63268	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	13176	1.45	<0.01
Q6URW6	Myosin-14	31	1.45	0.04
P62737	Actin_ aortic smooth muscle	14275	1.43	<0.01
Q9D0F9	Phosphoglucomutase-1	54	1.43	<0.01
Q03265	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial	403	1.39	<0.01
O09165	Calsequestrin-1	282	1.39	<0.01
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	878	1.39	<0.01
Q99LX0	Parkinson disease protein 7 homolog	606	1.36	<0.01

Q5XKE0	Myosin-binding protein C_ fast-type	88	1.35	<0.01
P0CG50	Polyubiquitin-C	988	1.34	0.02
Q64467	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific	1765	1.32	<0.01
P05977	Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform	11948	1.32	<0.01
P09542	Myosin light chain 3	1894	1.32	<0.01
Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	350	1.31	<0.01
P62984	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	988	1.31	<0.01
P07310	Creatine kinase M-type	8350	1.30	<0.01
P62983	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	988	1.30	0.01
Q8VDD5	Myosin-9	47	1.30	0.02
P20801	Troponin C_ skeletal muscle	422	1.27	0.04
P0CG49	Polyubiquitin-B	988	1.25	<0.01
P52480	Pyruvate kinase PKM	1945	1.25	<0.01
Q8CI94	Glycogen phosphorylase_ brain form	113	1.23	<0.01
P97457	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	9779	1.23	<0.01
P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	58	1.23	0.03
P97447	Four and a half LIM domains protein 1	73	1.23	0.04
P17182	Alpha-enolase	767	1.22	<0.01
O70250	Phosphoglycerate mutase 2	368	1.21	<0.01
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	1550	1.20	<0.01
P14152	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	219	1.20	<0.01
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	50	1.20	0.01
P21550	Beta-enolase	5170	1.17	<0.01
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8361	1.17	<0.01
P58774	Tropomyosin beta chain	8907	1.17	<0.01
P17183	Gamma-enolase	754	1.16	<0.01
P53657	Pyruvate kinase PKLR	826	1.16	0.01
P21107	Tropomyosin alpha-3 chain	2240	1.15	<0.01
Q9ET01	Glycogen phosphorylase_ liver form	113	1.13	0.02
P17751	Triosephosphate isomerase	715	1.11	<0.01

P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	3826	1.09	<0.01
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	9985	1.06	<0.01
P32848	**Parvalbumin alpha**	**5745**	**0.62**	**<0.01**
Q60605	**Myosin light polypeptide 6**	**355**	**0.26**	**<0.01**
Q9CQV8	14-3-3 protein beta/alpha	522	KO C*	-
P62259	14-3-3 protein epsilon	522	KO C*	-
P68510	14-3-3 protein eta	522	KO C*	-
P61982	14-3-3 protein gamma	522	KO C*	-
O70456	14-3-3 protein sigma	522	KO C*	-
P68254	14-3-3 protein theta	522	KO C*	-
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	671	KO C*	-
Q8BJY1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	67	KO C*	-
Q91ZV4	2-acylglycerol O-acyltransferase 1	131	KO C*	-
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	1328	KO C*	-
Q9CQJ0	Acyl-coenzyme A thioesterase THEM5	115	KO C*	-
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	299	KO C*	-
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	299	KO C*	-
Q00896	Alpha-1-antitrypsin 1-3	299	KO C*	-
Q00897	Alpha-1-antitrypsin 1-4	299	KO C*	-
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	309	KO C*	-
P57780	Alpha-actinin-4	163	KO C*	-
Q9DBR4	Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family B member 2	56	KO C*	-
Q3V0J4	Ankyrin repeat domain-containing protein 53	72	KO C*	-
Q8BZW2	Ankyrin repeat domain-containing protein SOWAHB	46	KO C*	-
P07356	Annexin A2	467	KO C*	-
P48036	Annexin A5	57	KO C*	-
Q3UHD9	Arf-GAP with GTPase_ ANK repeat and PH domain-containing protein 2	72	KO C*	-
Q9D0I9	Arginine--tRNA ligase_ cytoplasmic	54	KO C*	-
Q8BIP0	Aspartate--tRNA ligase_ mitochondrial	55	KO C*	-
Q99MQ4	Asporin	685	KO C*	-

Q9DB20	ATP synthase subunit O_ mitochondrial	92	KO C*	-
P28653	Biglycan	176	KO C*	-
P70408	Cadherin-10	74	KO C*	-
Q9CZM9	Calcium-activated potassium channel subunit beta-2	139	KO C*	-
Q8BH59	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	146	KO C*	-
P0DP26	Calmodulin-1	579	KO C*	-
P0DP27	Calmodulin-2	447	KO C*	-
P0DP28	Calmodulin-3	447	KO C*	-
Q9JM83	Calmodulin-4	288	KO C*	-
Q9D6P8	Calmodulin-like protein 3	76	KO C*	-
Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein	175	KO C*	-
Q640L3	Cell cycle progression protein 1	45	KO C*	-
Q9CZU6	Citrate synthase_ mitochondrial	80	KO C*	-
Q62507	Cochlin	217	KO C*	-
Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain	227	KO C*	-
Q60847	Collagen alpha-1(XII) chain	56	KO C*	-
Q02788	Collagen alpha-2(VI) chain	186	KO C*	-
P21180	Complement C2	47	KO C*	-
Q8VCG4	Complement component C8 gamma chain	121	KO C*	-
Q80YP0	Cyclin-dependent kinase 3	85	KO C*	-
Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1_ mitochondrial	30	KO C*	-
Q62425	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	515	KO C*	-
P62897	Cytochrome c_ somatic	163	KO C*	-
P56656	Cytochrome P450 2C39	70	KO C*	-
P28654	Decorin	1379	KO C*	-
Q9QZZ6	Dermatopontin	207	KO C*	-
Q9QYI3	DnaJ homolog subfamily C member 7	60	KO C*	-
Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha_ mitochondrial	70	KO C*	-
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	237	KO C*	-
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	202	KO C*	-

Q05816	Fatty acid-binding protein 5	97	KO C*	-
O54974	Galectin-7	353	KO C*	-
P06745	Glucose-6-phosphate isomerase	90	KO C*	-
P46412	Glutathione peroxidase 3	172	KO C*	-
Q8BH60	Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein	59	KO C*	-
Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A	121	KO C*	-
P17879	Heat shock 70 kDa protein 1B	121	KO C*	-
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	60	KO C*	-
P14602	Heat shock protein beta-1	223	KO C*	-
P68433	Histone H3.1	355	KO C*	-
P84228	Histone H3.2	355	KO C*	-
P84244	Histone H3.3	355	KO C*	-
P02301	Histone H3.3C	355	KO C*	-
P62806	Histone H4	3378	KO C*	-
Q3USB7	Inactive phospholipase C-like protein 1	129	KO C*	-
Q80V72	Inositol hexakisphosphate kinase 2	122	KO C*	-
Q5SF07	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	62	KO C*	-
Q9D783	Kelch-like protein 40	65	KO C*	-
A2AUC9	Kelch-like protein 41	80	KO C*	-
Q61765	Keratin_ type I cuticular Ha1	3733	KO C*	-
Q62168	Keratin_ type I cuticular Ha2	218	KO C*	-
Q8K0Y2	Keratin_ type I cuticular Ha3-I	3667	KO C*	-
Q61897	Keratin_ type I cuticular Ha3-II	3617	KO C*	-
Q9D646	Keratin_ type I cuticular Ha4	3411	KO C*	-
Q497I4	Keratin_ type I cuticular Ha5	510	KO C*	-
B1AQ75	Keratin_ type I cuticular Ha6	1152	KO C*	-
P08730	Keratin_ type I cytoskeletal 13	300	KO C*	-
Q61781	Keratin_ type I cytoskeletal 14	2702	KO C*	-
Q61414	Keratin_ type I cytoskeletal 15	1948	KO C*	-
Q9Z2K1	Keratin_ type I cytoskeletal 16	957	KO C*	-

Q9QWL7	Keratin_ type I cytoskeletal 17	1480	KO C*	-
P05784	Keratin_ type I cytoskeletal 18	218	KO C*	-
P19001	Keratin_ type I cytoskeletal 19	1288	KO C*	-
A1L317	Keratin_ type I cytoskeletal 24	329	KO C*	-
Q8VCW2	Keratin_ type I cytoskeletal 25	574	KO C*	-
Q9Z320	Keratin_ type I cytoskeletal 27	574	KO C*	-
A6BLY7	Keratin_ type I cytoskeletal 28	218	KO C*	-
Q6IFX3	Keratin_ type I cytoskeletal 40	472	KO C*	-
Q6IFX2	Keratin_ type I cytoskeletal 42	1288	KO C*	-
Q6RHW0	Keratin_ type I cytoskeletal 9	125	KO C*	-
Q6IMF0	Keratin_ type II cuticular 87	2283	KO C*	-
Q9ERE2	Keratin_ type II cuticular Hb1	2810	KO C*	-
Q99M74	Keratin_ type II cuticular Hb2	95	KO C*	-
Q99M73	Keratin_ type II cuticular Hb4	321	KO C*	-
Q9Z2T6	Keratin_ type II cuticular Hb5	2125	KO C*	-
P97861	Keratin_ type II cuticular Hb6	2810	KO C*	-
Q3UV17	Keratin_ type II cytoskeletal 2 oral	197	KO C*	-
P07744	Keratin_ type II cytoskeletal 4	197	KO C*	-
Q9DCV7	Keratin_ type II cytoskeletal 7	223	KO C*	-
Q9R0H5	Keratin_ type II cytoskeletal 71	426	KO C*	-
Q6IME9	Keratin_ type II cytoskeletal 72	140	KO C*	-
Q6NXH9	Keratin_ type II cytoskeletal 73	483	KO C*	-
Q6IFZ9	Keratin_ type II cytoskeletal 74	426	KO C*	-
Q8VED5	Keratin_ type II cytoskeletal 79	179	KO C*	-
P11679	Keratin_ type II cytoskeletal 8	422	KO C*	-
O35367	Keratocan	163	KO C*	-
Q9R190	Metastasis-associated protein MTA2	58	KO C*	-
B1AYB6	Methyl-CpG-binding domain protein 5	45	KO C*	-
Q62000	Mimecan	111	KO C*	-
P04247	Myoglobin	620	KO C*	-

Q91W39	Nuclear receptor coactivator 5	70	KO C*	-
Q8R4R6	Nucleoporin NUP35	67	KO C*	-
Q9Z1M0	P2X purinoceptor 7	72	KO C*	-
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	706	KO C*	-
P15331	Peripherin	749	KO C*	-
P48678	Prelamin-A/C	285	KO C*	-
P62962	Profilin-1	114	KO C*	-
Q9JK53	Prolargin	706	KO C*	-
Q3UY34	Protein CUSTOS	94	KO C*	-
P27773	Protein disulfide-isomerase A3	53	KO C*	-
P14069	Protein S100-A6	713	KO C*	-
Q8VCL2	Protein SCO2 homolog_ mitochondrial	67	KO C*	-
Q9D051	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta_ mitochondrial	146	KO C*	-
Q9JL25	Regulator of G-protein signaling 1	50	KO C*	-
Q91YM2	Rho GTPase-activating protein 35	168	KO C*	-
O35130	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	93	KO C*	-
Q921I1	Serotransferrin	88	KO C*	-
Q8BVL3	Sorting nexin-17	148	KO C*	-
Q8K031	StAR-related lipid transfer protein 8	79	KO C*	-
O88935	Synapsin-1	54	KO C*	-
O54887	Testis-specific serine kinase substrate	71	KO C*	-
Q9Z1T2	Thrombospondin-4	142	KO C*	-
Q9WVA4	Transgelin-2	275	KO C*	-
P40142	Transketolase	96	KO C*	-
P68369	Tubulin alpha-1A chain	262	KO C*	-
P05213	Tubulin alpha-1B chain	322	KO C*	-
P68373	Tubulin alpha-1C chain	262	KO C*	-
P05214	Tubulin alpha-3 chain	262	KO C*	-
P68368	Tubulin alpha-4A chain	301	KO C*	-
Q9JJZ2	Tubulin alpha-8 chain	240	KO C*	-

A2AQ07	Tubulin beta-1 chain	55	KO C*	-
Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	483	KO C*	-
Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	483	KO C*	-
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	589	KO C*	-
Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	424	KO C*	-
P68372	Tubulin beta-4B chain	479	KO C*	-
P99024	Tubulin beta-5 chain	636	KO C*	-
Q922F4	Tubulin beta-6 chain	211	KO C*	-
Q3U1V6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3	57	KO C*	-
Q9CPX6	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	100	KO C*	-
Q80U95	Ubiquitin-protein ligase E3C	44	KO C*	-
Q24JP4	Uncharacterized protein C5orf47 homolog	145	KO C*	-
Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	187	KO C*	-
O54927	WD repeat and SOCS box-containing protein 1	57	KO C*	-
Q8CDC7	Zinc finger and BTB domain-containing protein 9	71	KO C*	-
Q8CCG1	Zinc finger C2HC domain-containing protein 1C	58	KO C*	-
Q62158	Zinc finger protein RFP	111	KO C*	-
E9Q309	Centrosome-associated protein 350	42	WT C*	-
P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial	468	WT C*	-
Q9WVF7	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	30	WT C*	-
Q2MHE5	Docking protein 6	180	WT C*	-
Q69ZB0	Leucine-rich repeat and coiled-coil domain-containing protein 1	48	WT C*	-
P09041	Phosphoglycerate kinase 2	62	WT C*	-
Q6IRU2	Tropomyosin alpha-4 chain	49	WT C*	-
Q8VC23	Uncharacterized protein C11orf86 homolog	175	WT C*	-

°Identificação baseada no ID das proteínas do banco de dados *Uniprot Database* (http://wwwwww.uniprot.org/).

+Proteínas com expressão significativamente alterada estão organizadas de acordo com a razão.

A expressão diferencial entre os grupos foi expressa em $p < 0.05$. Proteínas destacadas em negrito encontram-se aumentadas ou diminuídas mais que 2 vezes.

* Proteínas únicas de cada grupo, dentro dessa comparação.

A **figura 18** mostra a análise funcional de acordo com o processo do sistema imunológico por *Gene Ontology (GO)* com o termo mais significativo para a comparação entre WT CAIA vs. WT C. Dentre eles, as categorias com os maiores percentuais de genes mais afetados no processo do sistema imunológico foram maturação eritrocitária (14,3%), desenvolvimento de eritrócitos (42,9%) e resposta imune inata na mucosa (42,9%).

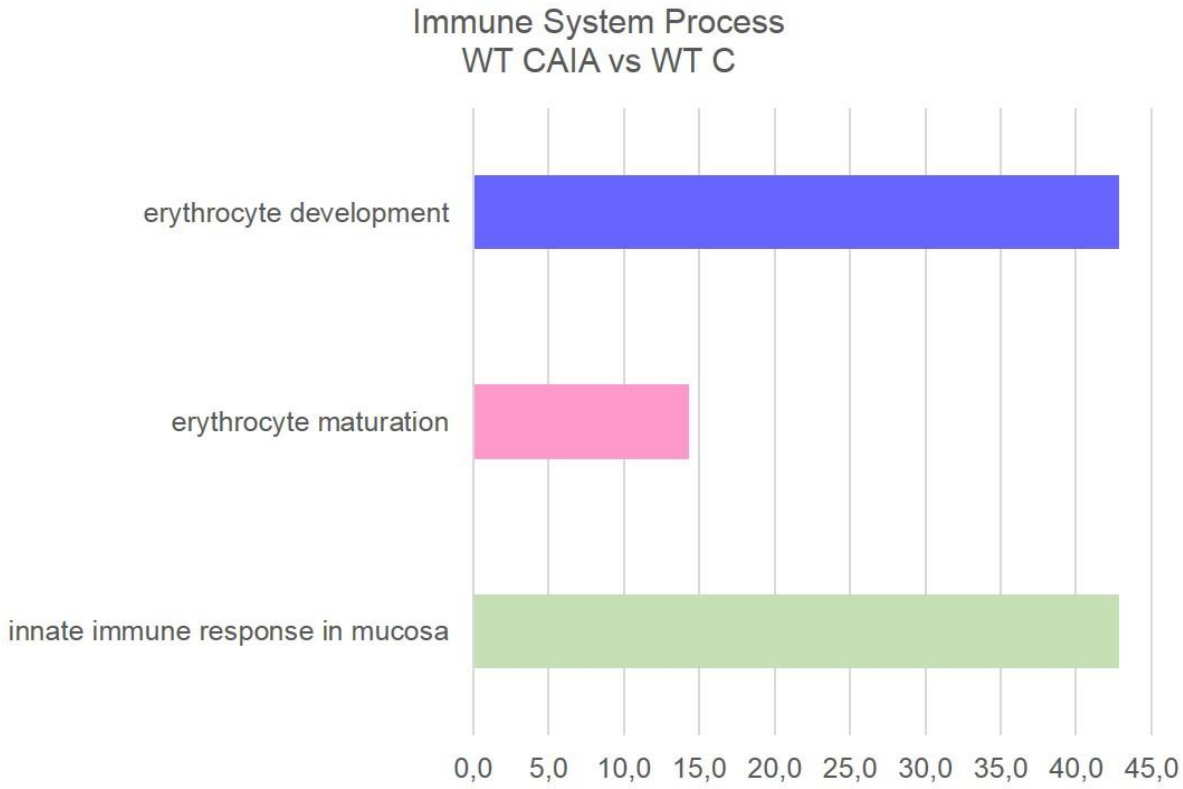


Figura 18. Gráfico da distribuição funcional em porcentagem, das proteínas identificadas com expressão diferencial na comparação WT CAIA vs WT C. Categoria de proteínas baseadas na ontologia genética (GO) do amplo Processo do Sistema Imune. Significância (Kappa= 0.04) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes associados. A ontologia genética foi avaliada segundo os *pluggins ClueGo*® v.2.5.7 do software *Cytoscape*® 3.8.2.

A **figura 19** mostra a análise funcional de acordo com o processo do sistema imunológico por *Gene Ontology (GO)* com o termo mais significativo, para a comparação entre KO CAIA vs. KO C. Nas categorias com porcentagens de genes no envolvidos no sistema imunológico, desenvolvimento de osteoclastos (8,3%), maturação de eritrócitos (8,3%), regulação positiva da quimiotaxia de neutrófilos (8,3%), regulação negativa de CD4 positivo, alfa -beta proliferação de células T (8,3%) e produção de citocinas de células dendríticas mieloides (8,3%), enquanto as

categorias com as porcentagens mais afetadas foram desenvolvimento de células mielóides (33,3%) e resposta imune inata na mucosa (25,0%).

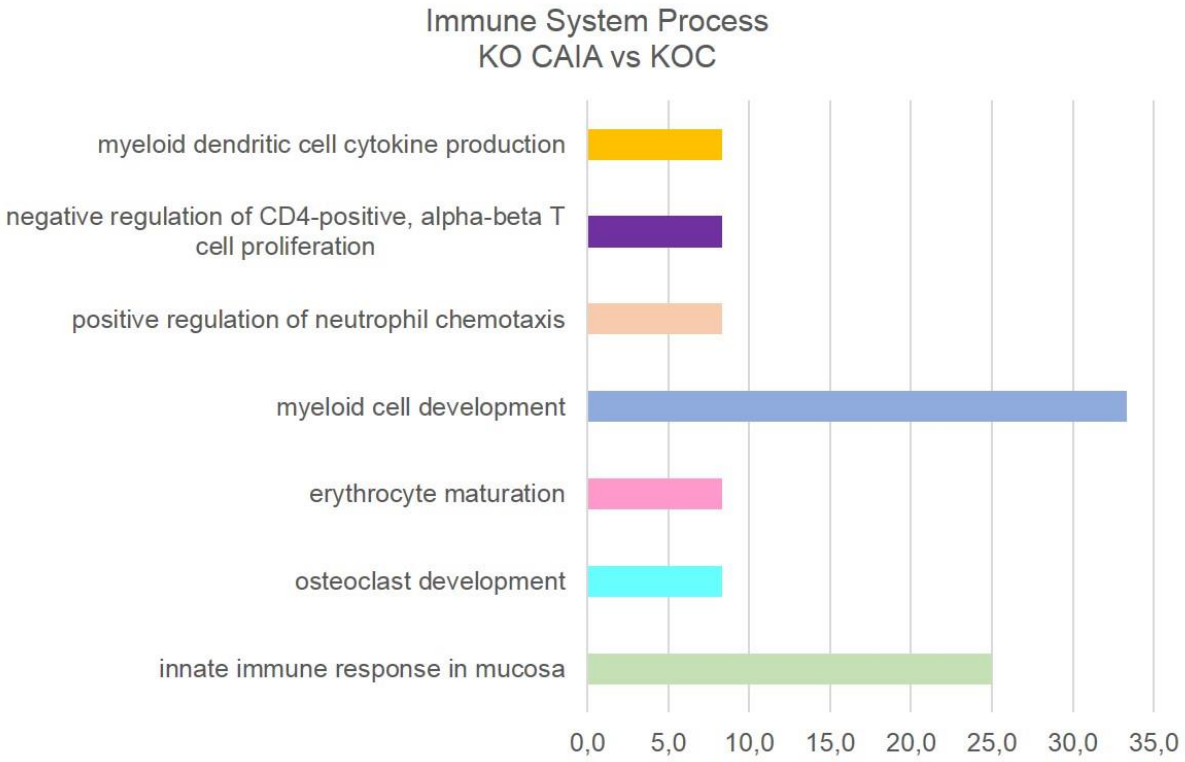


Figura 19. Gráfico da distribuição funcional em porcentagem, das proteínas identificadas com expressão diferencial na comparação KO CAIA vs KO C. Categoria de proteínas baseadas na ontologia genética (GO) do amplo do Sistema Imune. Significância (Kappa= 0.04) e distribuição de acordo a porcentagem do número de genes associados. A ontologia gênica foi avaliada segundo os *pluggins ClueGo*® v.2.5.7 do software *Cytoscape*® 3.8.2.

A **figura 20** mostra a análise funcional de acordo com o processo do sistema imunológico por *Gene Ontology (GO)* com o termo mais significativo, para a comparação entre KO CAIA vs. WT CAIA. Nas categorias com porcentagens de genes no processo do sistema imunológico, gostaríamos de enfatizar o estabelecimento da polaridade das células T (14,3%), a regulação positiva da resposta inflamatória aguda ao estímulo antigênico (14,3%), desenvolvimento de osteoclastos (14,3%) e regulação positiva da resposta imune humoral mediada pela circulação (14,3%), enquanto a categoria com a porcentagem mais afetada foi o desenvolvimento de células mielóides (42,9%).

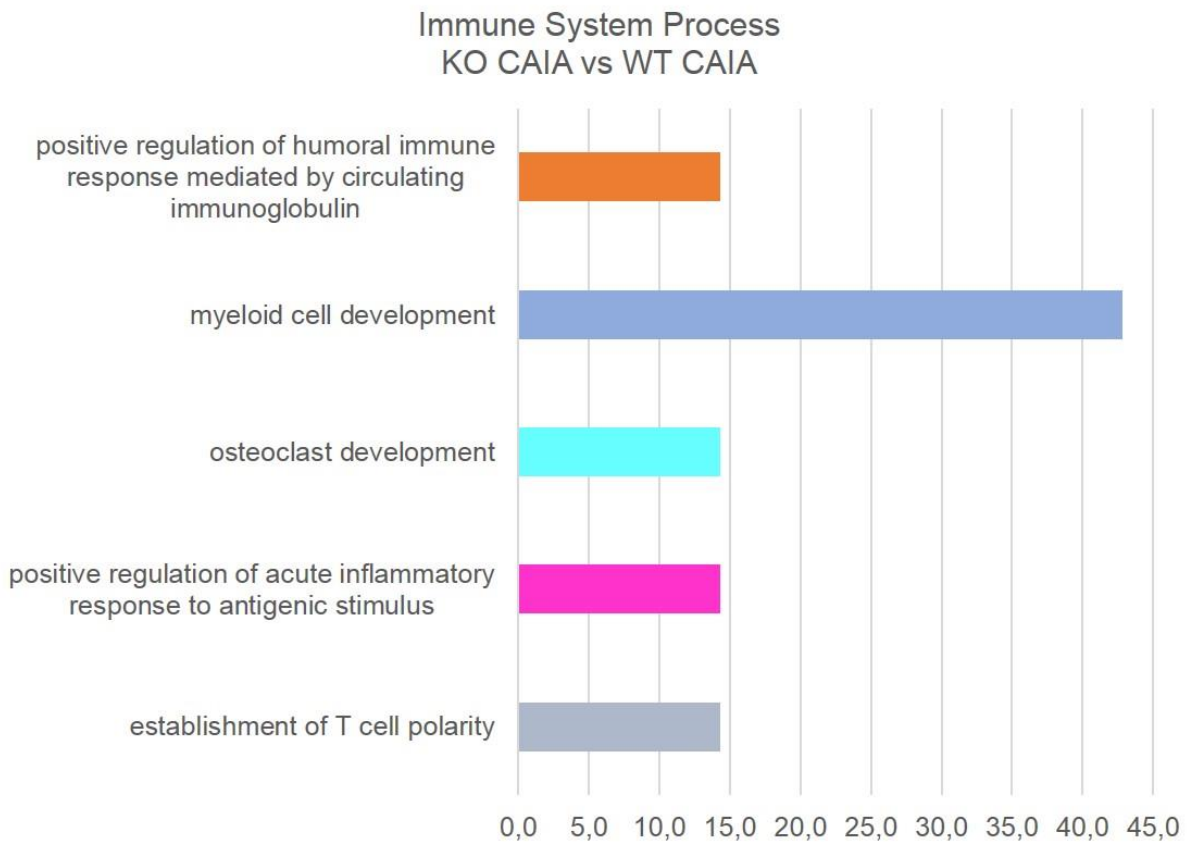


Figura 20. Gráfico da distribuição funcional em porcentagem, das proteínas identificadas com expressão diferencial na comparação KO CAIA vs WT CAIA. Categoria de proteínas baseadas na ontologia genética (GO) do amplo Processo do Sistema Imune. Significância (Kappa= 0.04) e distribuição de acordo a porcentagem do número de genes associados. A ontologia gênica foi avaliada segundo os *pluggins ClueGo*® v.2.5.7 do software *Cytoscape*® 3.8.2.

A **figura 21** mostra a análise funcional de acordo com o processo do sistema imunológico por *Gene Ontology (GO*), com o termo mais significativo para a comparação entre KO C vs WT C. Nas categorias com porcentagens de genes no processo do sistema imunológico, gostaríamos de enfatizar a regulação positiva da resposta inflamatória aguda ao estímulo antigênico (10,0%), regulação positiva da citotoxicidade mediada por células T (10,0%), estabelecimento da polaridade das células T (10,0 %), enquanto as categorias com os percentuais mais afetados foram desenvolvimento de eritrócitos (20,0%) e resposta imune humoral antimicrobiana mediada por peptídeo antimicrobiano (50,0%).

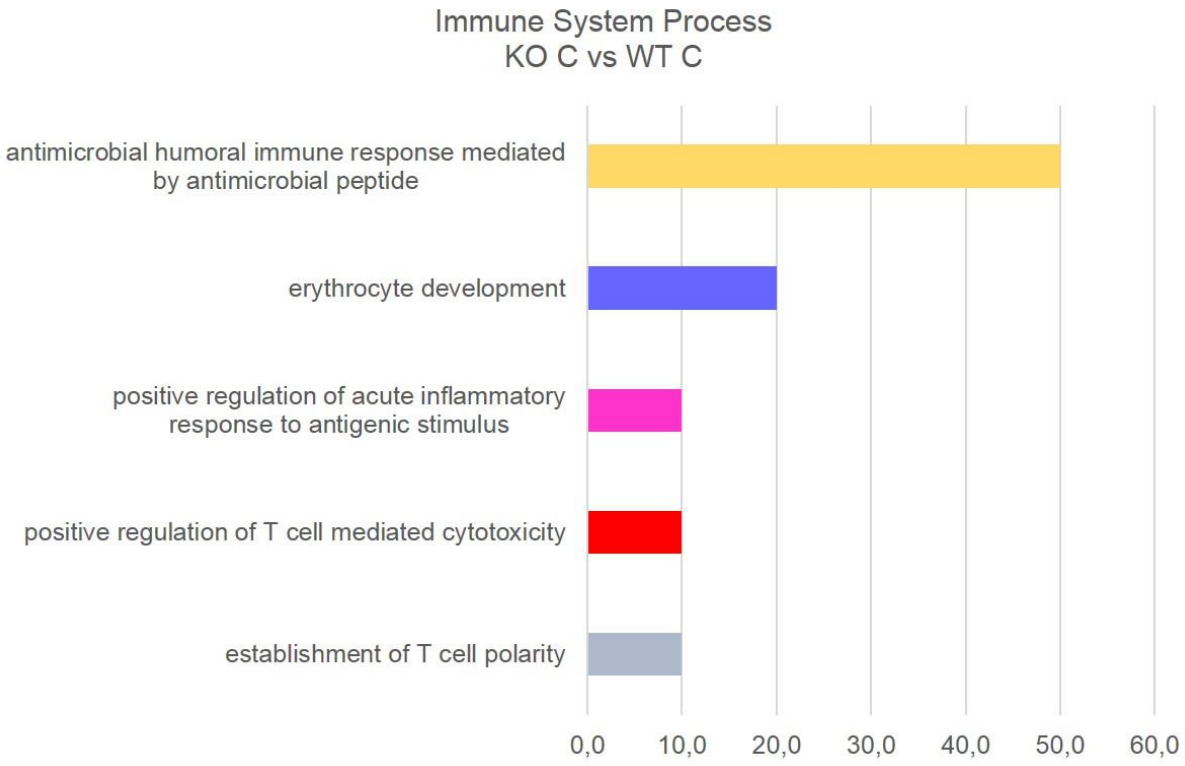


Figura 21. Gráfico da distribuição funcional em porcentagem, das proteínas identificadas com expressão diferencial na comparação KO C vs WT C. Categoria de proteínas baseadas na ontologia genética (GO) do amplo Processo do Sistema Imune. Significância (Kappa= 0.04) e distribuição de acordo com a porcentagem de número de genes associados. A ontologia genética foi avalizada segundo os plugins *ClueGo*® v.2.5.7 do software *Cytoscape*® 3.8.2.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

É de conhecimento que os leucotrienos são mediadores lipídicos envolvidos na inflamação de doenças osteo inflamatórias, podendo ainda, acentuar a magnitude desse processo inflamatório, como na artrite reumatoide.

As características histopatológicas da sinovite na artrite reumatoide incluem, hiperplasia da membrana sinovial, devido ao acúmulo de macrófagos e uma proliferação exacerbada de sinoviócitos, semelhantes a fibroblastos ativados, assim como processos neoangiogênicos e o influxo de inúmeras células do sistema imune[11, 65].

Como já mencionado, no presente trabalho, o máximo grau de sinovite apresentado nos animais que receberam a indução da artrite foi classificado como moderada, de acordo com Krenn et al, 2002[62].

Perilli e colaboradores (2015)[66] ao induzirem a artrite reumatoide em camundongos Balb/c, pelo método CAIA, reportaram que 90% dos camundongos apresentaram *score* elevados nas patas, baseado no *score* clínico, mensurado por paquímetro. Os mesmos autores sugerem que a medição por pletismômetro, equipamento capaz de detectar mudanças no volume das patas dos animais, seja preferível, entretanto devido ao tamanho pequeno das patas dos camundongos, esse método nem sempre é o mais adequado.

Em nosso trabalho, não obtivemos uma sinovite severa, como Perilli e colaboradores 2015[66]. O grau inflamatório moderado encontrado no grupo *wild type* nos direciona a questionar se o método CAIA seria a melhor alternativa para o estudo da artrite reumatoide na linhagem 129/Sv, uma vez que não obtivemos uma doença sistêmica, característica nessa condição.

Nossos achados mostraram que os animais WT CAIA apresentaram uma sinovite moderada, demonstrado nos ensaios de HE e Tricrômico de Masson, em contrapartida, os animais KO CAIA, não desenvolveram a doença. Adicionalmente, nossos dados na imunomarcação de IL-1β, confirmam os resultados de coloração, pois o grupo WT CAIA apresentou uma imunoexpressão dessa interleucina, significantemente maior ($p<0,005$) em comparação ao WT controle. Por outro lado, os

grupos 5-LO KO, não apresentaram diferença ao compararmos com o *wild type* controle.

As citocinas regulam inúmeros processos inflamatórios, e dentro de uma rede regulatória complexa, estão relacionadas a processos imunológicos específicos que acarretam numa autoimunidade, inflamação crônica e destruição do tecido[(67)]. Muitas estão implicadas no início e na progressão da artrite reumatoide, por exemplo, são mediados por citocinas pro inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucinas IL-1β, IL-6 entre outros[(68)].

A literatura reporta que as interleucinas IL-1 α e IL-1 β, são consideradas citocinas pro inflamatórias que conduzem as respostas imunes inatas, induzindo quimiocinas e citocinas para ativar e recrutar células do sistema imune, promovendo deste modo, a inflamação. Além disso, a IL-1 estimula a resposta imune adaptativa, ativando e promovendo células T helper (Th) 17 que produzem IL-17A e outras citocinas. A IL-17A, por sua vez, estimula a produção de quimiocinas para recrutar neutrófilos e outras células imune para a região inflamada, sendo ambas envolvidas na patofisiologia da artrite reumatoide[(69-71)].

Ruzek e colaboradores (2018)[(72)] ao neutralizarem IL-1β e IL-17A, com anticorpos monoclonais anti IL-1β e anti IL-17A em modelos animais, verificaram que essa neutralização quando aplicada isoladamente reduziu o inchaço nas patas, entretanto a combinação de ambos, promoveu uma diminuição mais significativa. Adicionalmente, a avaliação histológica confirmou uma inibição significativamente maior da inflamação na região articular, bem como a prevenção de danos à cartilagem e erosão óssea com o tratamento combinado em comparação com a monoterapia.

A produção de IL-6, por sua vez, também pode ser induzida por infecção e outros tipos de inflamação. A IL-6 é prontamente produzida, principalmente por macrófagos, em resposta a patógenos ou padrões moleculares associados a danos relacionados à inflamação, desempenhando uma função protetora, removendo agentes infecciosos e cicatrizando tecidos danificados por meio da indução de fase aguda e respostas imunológicas[(73, 74)].

Pesquisadores reportam que níveis desregulados de IL-6 são associados a várias doenças imunológicas, como a artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil sistêmica, doença de Crohn entre outros. A tocilizumabe, por exemplo, é um anticorpo

monoclonal anti-receptor da IL-6 humanizado e foi o primeiro fármaco que visa o receptor da IL-6[75].

Alguns estudos ainda, tem demonstrado que pacientes com AR, apresentam uma melhora em termos de sintomas e qualidade de vida, ao fazerem uso de drogas que possuem como alvo, antagonistas de IL-6 ou o seu receptor, principalmente para pacientes que não respondem adequadamente a terapia clássica, por isso, estudos mais aprofundados são necessários para identificar o padrão ouro para o tratamento da AR[74].

Apesar da interleucina, IL-6 estar envolvida na resposta inflamatória na artrite reumatoide, nossos resultados não apresentaram diferença na imunoexpressão, ao compararmos o grupo WT CAIA com os demais, entretanto, a explicação para tal evento, poderia estar associado ao número amostral. Devido a problemas metodológicos, apenas 3 animais por grupo, foram direcionados para os ensaios de coloração e imunomarcação. Adicionalmente, podemos verificar uma tendência na imunoexpressão da IL-6 para o grupo WT CAIA.

Os mecanismos relacionados a destruição e remodelamento ósseo na AR, assim como a complexidade da patogênese que envolve a proliferação celular, ativação de fatores pro-inflamatórios e angiogênese, ainda são pouco elucidados. O CD31, ou PECAM-1 (molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas) é uma proteína encontrada na superfície de plaquetas, monócitos, neutrófilos e alguns tipos de células T, constituindo grande parte das células endoteliais das junções intercelulares[76].

Melinte e colaboradores (2012)[76] ao compararem histologicamente a membrana sinovial e cartilagem entre pacientes com AR e osteoartrite, verificaram que a neovascularização, caracterizada pelo aumento de pequenos vasos, imunomarcadas por CD31, foi mais intensa em amostras de pacientes com AR, com intensa vascularização ao redor da cartilagem degenerada, principalmente nas áreas de invasão. Em nosso estudo, encontramos uma diferença significativa na imunoexpressão de CD31, em ambos os grupos que receberam a indução da artrite reumatoide em comparação ao *wild type* controle, entretanto, não encontramos proliferação vascular acentuada, uma vez que a sinovite foi moderada e sem formação de centro germinativo, mais comum na presença de uma sinovite severa.

A literatura relata que os fibroblastos são mediadores importantes em doenças inflamatórias e fibróticas crônicas. Além disso, faz o intermédio a deposição de matriz normal e a inflamação na cicatrização de feridas. Os fibroblastos cronicamente ativados, podem se diferenciar em mioblastos que produzem colágeno e são necessários para a fibrose no pulmão, fígado, intestino, pele, entre outros[(77)]. Os fibroblastos sinoviais, por sua vez, secretam citocinas e quimiocinas, invadindo e degradando a cartilagem e consequentemente, estimulando os osteoclastos na erosão óssea[(78-80)].

Rosa et al 2020[(64)], ao investigarem alterações nas células estromais TC/CD34+ em amostras de articulação de pacientes com artrite reumatoide, constataram que a sinovite na AR, pode ser caracterizada por uma diminuição notável na imunoexpressão de CD34, devido ao comprometimento grave na rede de células estromais TC/CD34+ em toda região sinovial, sugerindo uma investigação mais aprofundada se essas células simplesmente degeneram e desaparecem ou podem alterar seu imunofenótipo ao perder a expressão de CD34. Em nossos resultados de imunofluorescência, a imunoexpressão para CD34 não apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos controles e os que receberam indução da artrite reumatoide, ressaltando ainda, que apenas o grupo WT CAIA, apresentou uma sinovite moderada.

A análise proteômica identificou inúmeras proteínas, que se mostraram reguladas positiva ou negativamente. Vale ressaltar que foram encontradas proteínas exclusivas dentro de cada comparação realizada e foi realizada uma classificação funcional, identificando os maiores percentuais de genes envolvidos na AR.

É de conhecimento que o colágeno tipo I é considerado uma proteína chave, pois está intimamente relacionado com a qualidade, força e saúde óssea, sendo a principal proteína da matriz orgânica no osso, estando ainda, envolvido no processo de maturação, desenvolvimento e mineralização óssea[(81)]. A literatura demonstra que mutações gênicas codificam diferentes tipos de colágeno, levando a uma baixa mineralização óssea, entretanto, polimorfismos genéticos do gene da cadeia alfa 1, do colágeno tipo I, também estão associados a baixa densidade mineral óssea e risco de fraturas. Adicionalmente, a atividade funcional dos genótipos polimórficos está associada ao aumento da atividade de transcrição e aumento da síntese de colágeno

que leva ao desequilíbrio na relação da cadeia alfa-1 e alfa-2 normal (2: 1) do colágeno tipo I, percebido em distúrbios de mineralização óssea e queda da força óssea[81].

Deste modo, nossos resultados condizem com Kotisk e colaboradores (2013)[81], na análise de proteínas diferencialmente expressas, foram identificadas um aumento do colágeno tipo I, alfa-1 e alfa-2, reguladas positivamente em 7 e 5x no WT CAIA em relação ao WT controle, respectivamente (Tabela 3), devido à presença do infiltrado inflamatório instalado em decorrência do desenvolvimento da AR. Adicionalmente, a mesma proteína apresentou-se 2.8 e 2.56x, respectivamente, aumentadas, ao compararmos os grupos KO CAIA vs KO C (Tabela 4), sugerindo que esse aumento poderia estar relacionado a uma tentativa de resposta do sistema imune, diante da presença LPS.

Na comparação entre os grupos controles KO C vs WT C, identificamos uma regulação positiva do colágeno tipo I, alfa-1 e alfa-2 em 2.36 e 2.24x nos animais *knockouts,* respectivamente (Tabela 4). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ausência de leucotrienos está relacionada a maior potencial de diferenciação e mineralização de osteoblastos, devido ao aumento da atividade de fosfatase alcalina e deposição de cálcio da matriz extracelular, levantando a hipótese de que genes clássicos relacionados a formação óssea estariam superexpressos (dados ainda não publicados)[82], como demonstrado em nossos resultados acima mencionados em relação ao colágeno.

Uma explicação para o aumento expressivo de albumina em 5.47x no grupo WT CAIA (comparação WT CAIA vs WT C) e em 2.08x no grupo KO CAIA (comparação KO CAIA vs KO C) (Tabelas 3 e 4, respectivamente) estaria no fato de que a produção exacerbada de EROs (espécies reativas de oxigênio) presente na articulação inflamada, tem sido implicado como mediador inflamatório na condição de artrite reumatoide[83], concomitantemente com citocinas pro inflamatórias, pois o excesso de EROs pode promover uma modificação na região N-terminal da albumina sérica humana, resultando em uma albumina modificada pela isquemia. Adicionalmente, produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP), considerado marcador de estresse oxidativo, encontra-se aumentado em pacientes com AR, sendo que a formação ocorre através da ação do estresse oxidativo especialmente sobre a albumina[84, 85]. Adicionalmente, diante de uma resposta inflamatória, temos a presença de uma vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar que

inicialmente levarão para o espaço extravascular, eletrólitos e pequenas moléculas e posteriormente albumina e fibrinogênio[37].

Uma outra proteína que merece nossa atenção é a fibromodulina, regulada positivamente em 5.26x no grupo com artrite reumatoide induzida (comparação WT CAIA vs WT C) e 12.80x no grupo *knockout* (comparação KO C vs WT C) (Tabela 3 e 6, respectivamente), essa proteína encontra-se presente na matriz extracelular com múltiplas cadeias laterais de queratina, expressa e envolvida no desenvolvimento e manutenção da cartilagem, bem como na progressão da artrite[86]. O fato dessa proteína estar aumentada no grupo WT CAIA, estaria relacionado a inflamação instalada, devido a condição da artrite. Por outro lado, a explicação de um aumento em aproximadamente 13x no grupo *knockout*, estaria relacionado ao desenvolvimento e manutenção do colágeno e a um potencial de reparação mais acentuada, como observada pelo nosso grupo de pesquisa[82].

Observamos também, uma superexpressão em mais de 4x no WT CAIA e 2x no KO CAIA, de queratinas de citoesqueleto de diferentes tipos e isoformas, que estariam relacionados a uma reorganização do citoesqueleto devido ao ambiente inflamado. Segundo Aidinis et al 2005[87], evidencias demonstraram que o citoesqueleto possui um papel importante na regulação de vários processos celulares ligados a transformação celular e tumorigênese, assim como nos fibroblastos sinoviais artríticos.

Um outro dado que nos chamou a atenção, foi a regulação positiva da Vimentina em 3x no grupo KO CAIA (comparação KO CAIA VS KO C). A vimentina possui um papel importante na estabilização da arquitetura do citoplasma e segundo Su e colaboradores (2019)[88], a superexpressão dessa proteína, poderia reduzir significantemente a apoptose de monócitos em resposta a exposição ao LPS, sugerindo um potencial modulador da imunidade inata, uma vez que na supressão da Vimentina, desencadeou-se um aumento de citocinas pro inflamatórias (IL-6 e TNF-α). Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias (como por exemplo, IL-10) reguladas positivamente em células com superexpressão de Vimentina. Deste modo, o aumento na expressão de Vimentina nos animais *knockout* sugere uma resposta do sistema imune frente ao coquetel indutor da artrite reumatoide, assim como ao estímulo por LPS.

Um dado que merece atenção, na comparação entre os grupos *wild type, é o fato que grupo* WT CAIA apresentou uma superexpressão de 2 à 4x de várias isoformas de Histonas, aproximadamente 30, e na comparação entre os grupos *knockouts*, essa superexpressão foi de 2x, em aproximadamente 15 isoformas de Histonas no grupo KO CAIA. Adicionalmente, a mesma proteína não foi identificada sub ou superexpressa na comparação KO CAIA vs WT CAIA. Em contrapartida, ao compararmos os grupos controles, 15 isoformas de Histonas foram identificadas reguladas positivamente no grupo *knockout* em 3 à 6x.

Estudos tem demonstrado a associação entre variantes genéticas e artrite reumatoide, empregados na epigenética[89], incluindo metilação de DNA e acetilação de Histonas que podem ter um papel no desenvolvimento da AR[90]. O maior estudo de metilação do DNA de AR em indivíduos não aparentados identificou nove grupos com um padrão de metilação diferencial na região HLA em comparação com controles saudáveis, sugerindo que o efeito genético das variantes de risco HLA atua, em parte, em virtude da metilação alterada do DNA[91].

A literatura demonstra que a metilação do DNA fornece um mecanismo pelo qual fatores ambientais podem induzir mudanças na atividade celular. Em fumantes, por exemplo, os níveis de metilação eram mais altos em indivíduos com AR ACPA-positivo (Anticorpos antiproteina citrulinada positivo) que carregavam o alelo de risco HLA-DRB1 do que naqueles que não carregavam, esta diferença na metilação não foi observada em não fumantes[92]. Adicionalmente, dois estudos relataram que diferentes padrões de metilação e transcrição do DNA ocorrem em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos de diferentes articulações em pacientes com AR, este achado pode fornecer um mecanismo para explicar por que a AR tende a ser simétrica e afeta algumas articulações mais severamente do que outras[93]. Deste modo, vários estudos tem demonstrado que modificações epigenéticas como, metilação de DNA, modificações de histonas e microRNA, possuem um papel importante não apenas no desenvolvimento do câncer, assim como na artrite reumatoide.

Por outro lado, a proteína Ecotropic viral integration site 5, apresentou uma regulação positiva de aproximadamente 3x, no grupo KO CAIA, ao compararmos os grupos que receberam a indução da artrite. Essa proteína possui um papel importante na regulação do ciclo celular, citocinese e tráfego de membrana celular, atuando como

um fator de estabilização, mantendo o complexo promotor da anáfase/ciclossoma, resultando no acúmulo de ciclinas[94].

Proteínas relacionadas a atividade motora foram identificadas nos grupos analisados, como miosinas, actinas e suas isoformas. Alterações nessas estruturas estão relacionadas a mecanismos regulatórios de inibição/ativação da atividade motora[95].

Nossos resultados proteômicos evidenciam e reafirmam os dados apresentados nas colorações assim como nas imunomarcações de que a metodologia aplicada na indução da artrite reumatoide, apenas promoveu o desenvolvimento da artrite reumatoide, classificada como uma sinovite moderada nos camundongos *wild type* (129/Sv), diferentemente dos *knockouts* que não desenvolveram a doença.

Segundo Mendes e Silveira (2014)[96] o envolvimento do LTB_4 no desenvolvimento da artrite reumatoide é de se considerar, pois o B_4 é um potente mediador lipídico pro inflamatório, sintetizadas pelas células do sistema imune, estimulando a produção de várias citocinas.

Os nossos resultados nos direcionam a hipótese de que os animais *knockout* para 5-lipoxigenase, KO CAIA, apresentaram uma resistência ao modelo de indução da artrite reumatoide, pois não foi detectado a presença de sinovite nas articulações desses animais, de acordo com a classificação de Krenn et al (2002)[62] diferentemente do grupo WT CAIA.

Adicionalmente, a exclusividade do *knockout* apresentar vários subtipos da proteína *Glutathione S-transferase Mu*, envolvidos na desintoxicação celular e na defesa antioxidante[97] reforça nossos resultados do papel dos leucotrienos no não desenvolvimento da artrite reumatoide induzida nesses grupos.

Segundo Maclouf (1989)[98] demonstrou que por meio da biossíntese transcelular, as células podem atuar de forma cooperativa para a produção de leucotrienos. Portanto, células como neutrófilos geram LTA_4 que uma vez liberado pelas células, é usado por plaquetas para produção de LTC_4 ou pelos eritrócitos, para a produção de LTB_4 e este processo, pode ter uma eficiência em que 60 – 70% dos LTA_4 produzidos pelos neutrófilos ativados, podem ser liberados em outras células para a biossíntese transcelular de leucotrienos[99, 100].

Deste modo, ao analisarmos os percentuais de genes mais afetados na classificação funcional dos processos do sistema imunológico nas comparações, KO CAIA vs KO C e KO C vs WT C, encontramos um percentual de 8.3% para a maturação de eritrócitos e 20% no desenvolvimento de eritrócitos, respectivamente, que poderiam estar, portanto, relacionados na tentativa de biossíntese transcelular de leucotrienos, atuando como um mecanismo de compensação, devido ao silenciamento do gene Alox5.

Adicionalmente, os percentuais de genes afetados e envolvidos tanto o desenvolvimento quanto a maturação de eritrócitos, (42,9% e 14,3% respectivamente), na comparação WT CAIA vs WT C, estaria relacionada a presença do processo inflamatório na doença autoimune e uma relação com a anemia, visto que é essa condição é comumente apresentada em pacientes com artrite reumatoide[101].

Enfatizamos ainda que em duas comparações, KO CAIA vs KOC e KO CAIA vs WT CAIA, o grupo KO CAIA apresentou percentuais gênicos alterados de desenvolvimento de células mieloides em 33,3% e 42,9%, respectivamente, sugerindo que esta alteração estaria relacionada a dois fatores: ao processo inflamatório na tentativa de induzir a artrite reumatoide e como um mecanismo de compensação da atuação dos eritrócitos, na tentativa de produzir leucotrienos, relacionado a biossíntese transcelular.

Na categoria de resposta imune na mucosa, baseado nos processos imunológicos da ontologia genética, identificamos porcentagens de 42,9 e 25% nos grupos com artrite induzida, nas comparações WT CAIA x WT C e KO CAIA x KO C, respectivamente. O percentual encontrado no grupo *wild type,* evidencia a inflamação mais acentuada em relação ao *knockout.* A resposta imune na mucosa é a primeira linha de defesa da resposta adaptativa, frente a desafios infecciosos e vários fatores podem influenciar no desenvolvimento dessa resposta, como o estado nutricional, fatores genéticos, exposição a antígenos, entre outros[102]. A mucosa, portanto, é considerada a interface por meio da qual o hospedeiro interage com o ambiente e praticamente em todos os locais da mucosa, há mecanismos de barreiras físicas e imunológicas com o objetivo de proteger o hospedeiro contra patógenos ou toxinas potencialmente prejudiciais presentes nesse ambiente[103].

Em relação a porcentagem de genes afetados no grupo *knockout*, na comparação KO CAIA vs WT CAIA, identificamos a regulação positiva da resposta imune humoral mediada por imunoglobulinas circulantes, regulação positiva da resposta inflamatória aguda ao estímulo antigênico e desenvolvimento de osteoclastos, todos com 14,3%. Esses resultados apontam para uma resposta imune frente a um ambiente inflamatório. Tendo em vista que os animais *knockouts* não desenvolveram a AR, não podemos ignorar a presença de algumas células inflamatórias na região articular. Deste modo, os genes acima mencionados explicariam a presença de anticorpos circulantes contribuírem para a imunidade, estimulando a eliminação do patógeno e outras vias, na tentativa de combater e ou destruir o agente maléfico. A ausência total ou parcial de leucotrienos parece ter contribuição positiva na resposta imune frente a um patógeno.

Desafios encontrados

Diante do exposto, é importante pontuarmos algumas dificuldades e/ou limitações encontradas no presente estudo.

A proposta inicial do projeto, seria a coleta e análise da articulação do joelho, região comumente afetada na artrite reumatoide. Entretanto, após análise dos cortes histológicos, verificou-se que não havia processo inflamatório nessa articulação, mas, as patas anteriores e posteriores, apresentavam sinais clínicos do desenvolvimento da doença.

Diante disso, uma nova indução da artrite com o coquetel de anticorpos monoclonais anti-colágeno tipo II foi realizado, mas com um número amostral reduzido, devido aos custos para aquisição do indutor, o que consequentemente impossibilitou um número maior de amostras paras os ensaios de coloração e imunoexpressão.

Adicionalmente, gostaríamos de enfatizar a limitação da técnica aplicada na indução da artrite, no presente trabalho. A metodologia adotada foi seguindo as recomendações do próprio fabricante (Chondrex) para o tipo de linhagem de camundongo, uma vez que, o modelo tradicional, CIA, não é recomendado para a linhagem 129/Sv, pois estes, apresentam uma resistência à essa técnica, recomendando, portanto, o modelo CAIA.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados, podemos considerar que os leucotrienos possuem um papel importante no desenvolvimento da artrite reumatoide, pois ao induzirmos a AR em animais deficientes de leucotrienos, os mesmos não desenvolveram a doença. Em contrapartida, o grupo *wild type*, apresentou uma sinovite moderada, com diferenças significativas na expressão dos marcadores inflamatórios IL-1β e uma tendência positiva para IL-6. Enfatizamos ainda, que a técnica aplicada para indução da artrite não desenvolveu um quadro sistêmico nos camundongos *wild type*, visto que a articulação do joelho, por exemplo, não apresentou infiltrado inflamatório. Em relação a análise proteômica, várias proteínas se apresentaram reguladas positiva ou negativamente nas comparações realizadas, como proteínas relacionadas a produção de colágeno e presentes no processo inflamatório, confirmando ainda os resultados das colorações, pois não identificamos proteínas envolvidas no processo inflamatório mais severo, como metaloproteinases de matriz. Adicionalmente, proteínas exclusivas no grupo 5-LO foram identificadas, consideradas antioxidantes, nos direcionando a hipótese de que essas proteínas estariam sim, envolvidas no não desenvolvimento da sinovite nos camundongos *knockout.*

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Littlejohn EA, Monrad SU. Early Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. Prim Care. 2018;45(2):237-55.

2. Dario A, Külkamp W, Faraco H, Gevaerd M, Domenech S. Alterações psicológicas e exercício físico em pacientes com artrite reumatóide.: Motri; 2010.

3. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. Semin Arthritis Rheum. 2006;36(3):182-8.

4. M M, E B, M C. Rheumatoid Arthritis. Metabolism of Human Disease: Springer Viena; 2014.

5. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev. 2005;4(3):130-6.

6. Orlewska E, Ancuta I, Anic B, Codrenau C, Damjanov N, Djukic P, et al. Access to biologic treatment for rheumatoid arthritis in Central and Eastern European (CEE) countries. Med Sci Monit. 2011;17(4):SR1-13.

7. Silva G, Andrade E, Cherchiglia M, Almeida A, Guerra Junior A, Acurcio F. Perfil de gastos com tratamento da Artrite Reumatoide para pacientes do Sistema Único de Saúde de Minas Gerais, Brasil, de 2008 a 2013.: Ciênc. saude coletiva; 2018.

8. Almutairi K, Nossent J, Preen D, Keen H, Inderjeeth C. The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review. Rheumatol Int. 2021;41(5):863-77.

9. JL G, J R-P, FS T, R P, AM M, F F-L. Prevalence of rheumatoid arthritis in South-America: A systematic review and meta-analysis. Cien Saude Colet (periódico na internet); 2020.

10. Marques J, Gonçalves E, Langen L, Cunha M, Radominski S, Oliveira S, et al. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira.: Rev Bras Reumatol; 1993.

11. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2016;388(10055):2023-38.

12. Morinobu A, Tanaka S, Nishimura K, Takahashi S, Kageyama G, Miura Y, et al. Expression and Functions of Immediate Early Response Gene X-1 (IEX-1) in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. PLoS One. 2016;11(10):e0164350.

13. Yau AC, Holmdahl R. Rheumatoid arthritis: identifying and characterising polymorphisms using rat models. Dis Model Mech. 2016;9(10):1111-23.

14. Gavrilă BI, Ciofu C, Stoica V. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis, what is new? J Med Life. 2016;9(2):144-8.

15. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature. 2003;423(6937):356-61.

16. Chen CY, Su CM, Hsu CJ, Huang CC, Wang SW, Liu SC, et al. CCN1 Promotes VEGF Production in Osteoblasts and Induces Endothelial Progenitor Cell Angiogenesis by Inhibiting miR-126 Expression in Rheumatoid Arthritis. J Bone Miner Res. 2016.

17. Traianedes K, Dallas MR, Garrett IR, Mundy GR, Bonewald LF. 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. Endocrinology. 1998;139(7):3178-84.

18. Poczobutt JM, Nguyen TT, Hanson D, Li H, Sippel TR, Weiser-Evans MC, et al. Deletion of 5-Lipoxygenase in the Tumor Microenvironment Promotes Lung Cancer Progression and Metastasis through Regulating T Cell Recruitment. J Immunol. 2016;196(2):891-901.

19. Hammarström S. Leukotrienes. Annu Rev Biochem. 1983;52:355-77.

20. Mathis S, Jala VR, Haribabu B. Role of leukotriene B4 receptors in rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev. 2007;7(1):12-7.

21. Kuwabara K, Jyoyama H, Fleisch JH, Hori Y. Inhibition of antigen-induced arthritis in guinea pigs by a selective LTB4 receptor antagonist LY293111Na. Inflamm Res. 2002;51(11):541-50.

22. Bonewald LF, Flynn M, Qiao M, Dallas MR, Mundy GR, Boyce BF. Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. Adv Exp Med Biol. 1997;433:299-302.

23. Henderson WR. The role of leukotrienes in inflammation. Ann Intern Med. 1994;121(9):684-97.

24. Ahmadzadeh N, Shingu M, Nobunaga M, Tawara T. Relationship between leukotriene B4 and immunological parameters in rheumatoid synovial fluids. Inflammation. 1991;15(6):497-503.

25. Kierszenbaum A. Histology and cell biology: an introduction to pathology. Elsevier; 2004.

26. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol. 2008;61(5):577-87.

27. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. Ann Clin Biochem. 2014;51(Pt 2):189-202.

28. Smith W, Murphy R. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathway. In: Science E, editor. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam2002.

29. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science. 2001;294(5548):1871-5.

30. Chen JX, Xue KY, Xin JJ, Yan X, Li RL, Wang XX, et al. 5-Lipoxagenase deficiency attenuates L-NAME-induced hypertension and vascular remodeling. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019;1865(9):2379-92.

31. Yousefi B, Jadidi-Niaragh F, Azizi G, Hajighasemi F, Mirshafiey A. The role of leukotrienes in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 2013.

32. Peres CM, Aronoff DM, Serezani CH, Flamand N, Faccioli LH, Peters-Golden M. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. J Immunol. 2007;179(8):5454-61.

33. Hoxha M, Lewis-Mikhael AM, Bueno-Cavanillas A. Potential role of leukotriene receptor antagonists in reducing cardiovascular and cerbrovascular risk: A systematic review of human clinical trials and in vivo animal studies. Biomed Pharmacother. 2018;106:956-65.

34. Hoxha M. A systematic review on the role of eicosanoid pathways in rheumatoid arthritis. Adv Med Sci. 2018;63(1):22-9.

35. Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, et al. Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene Alox15. Science. 2004;303(5655):229-32.

36. Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Lajeunesse D. Study of the role of leukotriene B()4 in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. Arthritis Rheum. 2002;46(7):1804-12.

37. Cruvinel W, Mesquita Junior D, Araujo J, Catelan T, Souza A, Silva N, et al. Immune system - Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. Rev. Bras. Reumatol.; 2010.

38. Taams LS. Inflammation and immune resolution. Clin Exp Immunol. 2018;193(1):1-2.

39. Abbas AK, Lichtam AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th, editor: Sanders; 2015.

40. Alivernini S, Tolusso B, Ferraccioli G, Gremese E, Kurowska-Stolarska M, McInnes IB. Driving chronicity in rheumatoid arthritis: perpetuating role of myeloid cells. Clin Exp Immunol. 2018;193(1):13-23.

41. Svendsen AJ, Kyvik KO, Houen G, Junker P, Christensen K, Christiansen L, et al. On the origin of rheumatoid arthritis: the impact of environment and genes--a population based twin study. PLoS One. 2013;8(2):e57304.

42. Scott IC, Steer S, Lewis CM, Cope AP. Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2011;25(4):447-68.

43. Morais R, Sobrinho H, Gomes C, Quixabeira V, Cruvinel W. Artrite reumatoide: revisão dos aspectos imunológicos. EVS; 2014. p. 591-601.

44. Reveille JD. Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future. J Rheumatol Suppl. 2005;72:10-3.

45. Bang SY, Lee KH, Cho SK, Lee HS, Lee KW, Bae SC. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. Arthritis Rheum. 2010;62(2):369-77.

46. Tsai S, Santamaria P. MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity. Front Immunol. 2013;4:321.

47. Michou L, Lasbleiz S, Rat AC, Migliorini P, Balsa A, Westhovens R, et al. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(5):1649-54.

48. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Annu Rev Pathol. 2009;4:417-34.

49. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet. 2007;80(5):867-75.

50. Kobayashi S, Momohara S, Kamatani N, Okamoto H. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. FEBS J. 2008;275(18):4456-62.

51. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. Nat Rev Immunol. 2017;17(1):60-75.

52. Alarcon R, Andrade L. Anticorpos Antiproteínas Citrulinadas e a Artrite Reumatoide.: Rev. Bras. Reumatol; 2007.

53. Olumuyiwa-Akeredolu OO, Pretorius E. Platelet and red blood cell interactions and their role in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 2015;35(12):1955-64.

54. Goronzy JJ, Shao L, Weyand CM. Immune aging and rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. 2010;36(2):297-310.

55. Fujii H, Shao L, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(11):4360-5.

56. Weyand CM, Fujii H, Shao L, Goronzy JJ. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2009;5(10):583-8.

57. Massoumi R, Sjölander A. The role of leukotriene receptor signaling in inflammation and cancer. ScientificWorldJournal. 2007;7:1413-21.

58. Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. Prog Lipid Res. 2008;47(2):107-26.

59. Dario A, Külkamp W, Faraco H, Gevaerd M, Domenech S. Alterações psicológicas e exercício físico em pacientes com artrite reumatóide.: Motri; 2010.

60. Boots AM, Maier AB, Stinissen P, Masson P, Lories RJ, De Keyser F. The influence of ageing on the development and management of rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2013;9(10):604-13.

61. Chondrex I. Collagen Antibody-Induced Arthritis in Mice. Redmond, WA, US.2017.

62. Krenn V, Morawietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, König A. Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. Pathol Res Pract. 2002;198(5):317-25.

63. Fonseca FP, Bingle L, Santos-Silva AR, Lopes MA, de Almeida OP, de Andrade BA, et al. Semaphorins and neuropilins expression in salivary gland tumors. J Oral Pathol Med. 2016;45(2):119-26.

64. Rosa I, Faussone-Pellegrini MS, Romano E, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M, Manetti M. Impairment in the telocyte/CD34+ stromal cell network in rheumatoid arthritis synovium. J Cell Mol Med. 2021;25(4):2274-8.

65. van de Sande MG, Baeten DL. Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways. Rheumatology (Oxford). 2016;55(4):599-606.

66. Perilli E, Cantley M, Marino V, Crotti TN, Smith MD, Haynes DR, et al. Quantifying not only bone loss, but also soft tissue swelling, in a murine inflammatory arthritis model using micro-computed tomography. Scand J Immunol. 2015;81(2):142-50.

67. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. Lancet. 2017;389(10086):2328-37.

68. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 2011;365(23):2205-19.

69. Jesus AA, Goldbach-Mansky R. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. Annu Rev Med. 2014;65:223-44.

70. Canavan TN, Elmets CA, Cantrell WL, Evans JM, Elewski BE. Anti-IL-17 Medications Used in the Treatment of Plaque Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Comprehensive Review. Am J Clin Dermatol. 2016;17(1):33-47.

71. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin Chim Acta. 2016;455:161-71.

72. Ruzek MC, Huang L, Zhang TT, Bryant S, Slivka PF, Cuff CA, et al. Dual Blockade of Interleukin-1. J Pharmacol Exp Ther. 2018;364(3):474-84.

73. Pandolfi F, Altamura S, Frosali S, Conti P. Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair. Clin Ther. 2016;38(5):1017-28.

74. Pandolfi F, Franza L, Carusi V, Altamura S, Andriollo G, Nucera E. Interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis. Int J Mol Sci. 2020;21(15).

75. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. Nat Clin Pract Rheumatol. 2006;2(11):619-26.

76. Melinte R, Jung I, Georgescu L, Gurzu S. VEGF and CD31 expression in arthritic synovium and cartilage of human knee joints. Rom J Morphol Embryol. 2012;53(4):911-5.

77. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. N Engl J Med. 2015;373(1):96.

78. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. Nat Rev Rheumatol. 2013;9(1):24-33.

79. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. Science. 2007;315(5814):1006-10.

80. Turner JD, Filer A. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis. Curr Opin Rheumatol. 2015;27(2):175-82.

81. Kostik MM, Smirnov AM, Demin GS, Mnuskina MM, Scheplyagina LA, Larionova VI. Genetic polymorphisms of collagen type I α1 chain (COL1A1) gene increase the frequency of low bone mineral density in the subgroup of children with juvenile idiopathic arthritis. EPMA J. 2013;4(1):15.

82. Oliveira FA. Mecanismos intracelulares induzidos por leucotrienos durante a diferenciação osteogênica. Bauru - SP: Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo; 2017.

83. Yu DH, Yi JK, Yuh HS, Park S, Kim HJ, Bae KB, et al. Over-expression of extracellular superoxide dismutase in mouse synovial tissue attenuates the inflammatory arthritis. Exp Mol Med. 2012;44(9):529-35.

84. Piwowar A. [Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property]. Pol Merkur Lekarski. 2010;28(164):166-9.

85. Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. Cell Biochem Funct. 2006;24(4):307-11.

86. Li T, Jing J, Sun L, Jiang B, Xin S, Yang J, et al. TLR4 and MMP2 polymorphisms and their associations with cardiovascular risk factors in susceptibility to aortic aneurysmal diseases. Biosci Rep. 2019;39(1).

87. Aidinis V, Carninci P, Armaka M, Witke W, Harokopos V, Pavelka N, et al. Cytoskeletal rearrangements in synovial fibroblasts as a novel pathophysiological determinant of modeled rheumatoid arthritis. PLoS Genet. 2005;1(4):e48.

88. Su LX, Pan P, Wang XT, Long Y, Liu DW, Zhou X. Vimentin modulates apoptosis and inflammatory cytokine release by a human monocytic cell line (THP-1) in response to lipopolysaccharides in vitro. Chin Med J (Engl). 2019;132(11):1336-43.

89. Trynka G, Sandor C, Han B, Xu H, Stranger BE, Liu XS, et al. Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. Nat Genet. 2013;45(2):124-30.

90. Gomez-Cabrero D, Almgren M, Sjöholm LK, Hensvold AH, Ringh MV, Tryggvadottir R, et al. High-specificity bioinformatics framework for epigenomic profiling of discordant twins reveals specific and shared markers for ACPA and ACPA-positive rheumatoid arthritis. Genome Med. 2016;8(1):124.

91. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. Nat Biotechnol. 2013;31(2):142-7.

92. Meng W, Zhu Z, Jiang X, Too CL, Uebe S, Jagodic M, et al. DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2017;19(1):71.

93. Frank-Bertoncelj M, Trenkmann M, Klein K, Karouzakis E, Rehrauer H, Bratus A, et al. Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions. Nat Commun. 2017;8:14852.

94. Cai T, Zhou J, Zeng Y, Du W, Zhang Y, Liu T, et al. EVI5 is an oncogene that regulates the proliferation and metastasis of NSCLC cells. J Exp Clin Cancer Res. 2020;39(1):84.

95. Heissler SM, Sellers JR. Various Themes of Myosin Regulation. J Mol Biol. 2016;428(9 Pt B):1927-46.

96. Mendes MT, Silveira PF. The interrelationship between leukotriene B4 and leukotriene-A4-hydrolase in collagen/adjuvant-induced arthritis in rats. Biomed Res Int. 2014;2014:730421.

97. Cheng CH, Ma HL, Deng YQ, Feng J, Chen XL, Guo ZX. The role of Mu-type glutathione S-transferase in the mud crab (Scylla paramamosain) during ammonia stress. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2020;227:108642.

98. Maclouf J, Murphy RC, Henson PM. Transcellular sulfidopeptide leukotriene biosynthetic capacity of vascular cells. Blood. 1989;74(2):703-7.

99. Sala A, Testa T, Folco G. Leukotriene A4, and not leukotriene B4, is the main 5-lipoxygenase metabolite released by bovine leukocytes. FEBS Lett. 1996;388(2-3):94-8.

100. Sala A, Bolla M, Zarini S, Müller-Peddinghaus R, Folco G. Release of leukotriene A4 versus leukotriene B4 from human polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem. 1996;271(30):17944-8.

101. Wilson A, Yu HT, Goodnough LT, Nissenson AR. Prevalence and outcomes of anemia in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. Am J Med. 2004;116 Suppl 7A:50S-7S.

102. Maruyama K, Hida M, Kohgo T, Fukunaga Y. Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens. Pediatr Int. 2009;51(3):342-5.

103. Lucchino B, Spinelli FR, Iannuccelli C, Guzzo MP, Conti F, Di Franco M. Mucosa-Environment Interactions in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Cells. 2019;8(7).

ANEXOS

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Ciências Biológicas
Disciplina de Bioquímica

Bauru, 08 de maio de 2017

Senhora Presidente,

Solicitamos à Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais a autorização para uso de animais no projeto de pesquisa intitulado **"Mecanismos induzidos por leucotrienos na condição de artrite"**, tendo como pesquisador responsável Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira.

Como parte da documentação solicitada por essa Comissão para a avaliação de projetos de pesquisas envolvendo animais, declaramos estar ciente da realização da referida pesquisa neste departamento/disciplina e de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Informamos que o trabalho só poderá ser iniciado, após aprovação de uma Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais.

Atenciosamente,

Prof. Dr.Rodrigo Cardoso de Oliveira
Pesquisador Responsável

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Chefe do Departamento de Ciências Biológicas

Profª Drª Ana Paula Campanelli
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais/FOB/USP

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: **rodrigocardoso@usp.br** – Fone/FAX (0xx14) **32358246**
http://www.fob.usp.br

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Uso Animais

CEEPA-Proc. Nº 007/2017.

Bauru, 5 de dezembro de 2018.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alterações no período de vigência e sexo dos animais da pesquisa intitulada ***"Mecanismos induzidos por leucotrienos na condição de artrite"*** tendo Vossa Senhoria como Pesquisador Responsável, que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foram APROVADAS e referendadas na reunião ordinária da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) realizada no dia 19/10/2018.

Vigência do projeto:	*Setembro/2017 a Julho/2019*
Espécie/Linhagem:	*Camundongo isogênico 129/Sv e Knockout/5-LO KO*
Nº de animais:	*60 (30 animais de cada espécie)*
Peso/Idade	*18g-30g / 7 - 8 semanas*
Sexo:	*Fêmeas*
Origem:	*Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP*

Esta CEUA solicita que ao final da pesquisa seja enviado um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Paula Campanelli
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: ceua@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
http://www.fob.usp.br

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Uso de Animais

CEEPA-Proc. Nº 007/2017

Bauru, 22 de agosto de 2019.

Senhor Professor,

Em atenção à emenda apresentada com solicitação de prorrogação do período de vigência do projeto de pesquisa denominado ***"Mecanismos induzidos por leucotrienos na condição de artrite"***, registrada sob *CEUA-Proc. Nº 007/2017,* tendo Vossa Senhoria como Pesquisador Responsável, que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, foi analisada e considerada APROVADA *"ad referendum"* da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), nesta data.

Lembramos que ao final da pesquisa seja enviado um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Paula Campanelli
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: ceua@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
http://www.fob.usp.br