

LIZANDRE KEREN RAMOS DA SILVEIRA

**Efeito da imunoterapia com colágeno V no processo
inflamatório e remodelamento do tecido sinovial na artrite
experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientadora: Dra. Walcy Paganelli Rosolia
Teodoro

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO

2023

LIZANDRE KEREN RAMOS DA SILVEIRA

**Efeito da imunoterapia com colágeno V no processo
inflamatório e remodelamento do tecido sinovial na artrite
experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientadora: Dra. Walcy Paganelli Rosolia
Teodoro

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silveira, Lizandre Keren Ramos da
Efeito da imunoterapia com colágeno V no
processo inflamatório e remodelamento do tecido
sinovial na artrite experimental / Lizandre Keren
Ramos da Silveira. -- São Paulo, 2023.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientadora: Walcy Paganelli Rosolia Teodoro.

Descritores: 1.Sinovite 2.Artrite 3.Colágeno
4.Colágeno V 5.Imunoterapia 6.Tolerância

USP/FM/DBD-099/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Claudino e Wânia, por serem a
minha base e meus exemplos de vida, por todo
amor e cuidado.*

*Ao homem da minha vida Weverton, por todo
amor, cumplicidade e por tornar minha vida
mais leve.*

AGRADECIMENTOS

É muito gratificante concluir uma importante fase da minha carreira profissional em uma instituição de grande prestígio, a USP, onde sonhava tanto em estudar desde o ensino médio. Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter aberto essa porta e colocado em meu caminho pessoas tão incríveis que levarei por toda a vida.

Especialmente à Dra. Walcy Teodoro por ser muito mais que uma orientadora para mim, obrigada por ser amiga, companheira, e muitas vezes até uma mãe que cuida de todos os seus alunos de forma singular. Obrigada por ter me dado esta oportunidade e ter confiado em mim para a realização deste projeto de pesquisa.

À Dra. Ana Paula Velosa por sua dedicação em me orientar e ensinar com toda paciência do mundo seus conhecimentos, por me ajudar em cada técnica e em cada experimento. Obrigada por todo suporte e carinho ao longo deste percurso.

Obrigada Dras. Walcy e Ana Paula, por me moldarem e me tornarem uma profissional melhor.

À Profa. Dra. Vera Capelozzi e ao departamento de patologia que se dispuseram a nos ajudar. Obrigada professora por todos ensinamentos e auxílio em cada etapa deste projeto de pesquisa. Bem como, a Sandra Fernezlian que padronizou todas as marcações por imunohistoquímica.

Aos Dr. Sérgio Catanozi e Antônio Santos Filho por todo auxílio com os animais durante o experimental, obrigada por todos os conselhos e ensinamentos.

Ao Marco Aurélio Pereira que prontamente se dispôs a ajudar com o modelo experimental, e por cada palavra amiga que me encorajou a prosseguir.

Ao Dr. Fabio Marques, à Dra. Daniele Faria e à Dra. Caroline Gregório do laboratório de Medicina Nuclear, que realizaram as imagens por PET/CT e as quantificaram.

Ao Dr. Ricardo Fuller por sua disponibilidade em nos ajudar a enviar esse trabalho para o “Encontro de Reumatologia Avançada” e por todo conhecimento compartilhado.

Às minhas grandes amigas e irmãs que Deus me deu, Zelita Queiroz por toda paciência, ajuda e conselhos sábios vindos diretamente de Deus; Vitória Contini por todas as risadas, por sempre ver o lado bom das coisas e me encorajar; Thays Matos por proporcionar tantos momentos alegres, por sempre me ajudar a enfrentar as situações difíceis com palavras de fé e por me dar forças para continuar; e Amanda Yanke por me impulsionar a ser melhor e correr atrás dos meus sonhos. Amo vocês e sem o apoio de cada uma eu não teria conseguido.

Às amigas e companheiras de laboratório Fabíola Robertoni e Valéria Berton, obrigada por cada momento compartilhado.

À minha irmã e confidente Deyse Ferreira, que está sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças em todas as áreas da minha vida.

Ao amor da minha vida e meu porto seguro Weverton Ferreira, por sempre me encorajar a lutar por meus sonhos e por tornar minha vida mais leve e feliz. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação que tem por mim, te amo.

Aos meus pais Claudino Silveira e Wânia Silveira, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa de caráter e a correr atrás dos meus sonhos. Sou grata por todos os sacrifícios feitos por mim, por todos os conselhos, devoção e amor ao longo da minha vida. Amo vocês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (processo nº 2019/24178-0).

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos!

Este trabalho recebeu apoio financeiro de:

FAPESP: Bolsa de Mestrado – Fluxo Contínuo, processo nº 2019/24178-0

EPÍGRAFE

*Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e
juntamente entendam que a mão do Senhor fez isto (...)*

Isaías 41:20

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Sinovite	1
1.2- Modelos experimentais	4
1.3- Colágeno tipo V no tecido sinovial	6
1.4- Tolerância oral	8
1.5- Justificativa.....	11
2- OBJETIVO	14
3- MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1- Animais	16
3.2- Indução da inflamação articular	16
3.3- Protocolo da administração de colágeno V.....	16
3.4- Avaliação de processo inflamatório utilizando [18F]FDG.....	18
3.5- Mensuração do diâmetro articular.....	19
3.6- Coleta das amostras	19
3.7- Avaliação histológica	19
3.7.1- Escore histopatológico.....	20
3.8- Imunohistoquímica para células inflamatórias e apoptose celular	21
3.8.1- Quantificação para células inflamatórias e apoptose celular	22
3.9- Colocalização do colágeno V e marcadores celulares por imunofluorescência	23
3.10- Avaliação do colágeno no tecido sinovial	24
3.10.1- Imunofluorescência para colágeno dos tipos I, III e V	24
3.10.2- Quantificação do colágeno dos tipos I, III e V por histomorfometria	25
3.11- Perfil de anticorpos anticolágeno no soro	25
3.11.1- ELISA para anticolágeno II e V.....	26
3.12- Análise estatística	26
4- RESULTADOS	29
4.1- Análise da Variação do Diâmetro Articular	29

4.2- Monitoramento do efeito da imunoterapia oral com colágeno V por [18F]FDG por PET/CT	30
4.3- Análise morfológica do tecido sinovial e escore histopatológico.....	32
4.4- Análise do infiltrado inflamatório e apoptose celular	34
4.5- Alterações da matriz fibrilar no tecido sinovial	44
4.6- Análise da colocalização do colágeno V e marcadores celulares no tecido sinovial	48
4.7- Análise da pesquisa de anticorpos anticolágeno do tipo V no soro	52
5- DISCUSSÃO	54
6- CONCLUSÃO	62
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos mecanismos envolvidos na tolerância oral.....	9
Figura 2 - Esquema de indução de artrite.	17
Figura 3 - Esquema de indução de artrite e administração de colágeno V	17
Figura 4 - Esquema grupo controle administrado com colágeno V.	17
Figura 5 - Imagem representativa da análise de imagens de PET/CT pelo software AMIDE.	19
Figura 6 - Representação gráfica da variação do diâmetro articular	30
Figura 7 - PET/CT para captação do [18F]FDG nas articulações	32
Figura 8 - Painel de H&E e escore de <i>Krenn</i>	33
Figura 9 - Imunomarcção para linfócitos T totais (CD3+) no tecido sinovial ..	36
Figura 10 - Imunomarcção para linfócitos T CD4+ no tecido sinovial.....	37
Figura 11 - Imunomarcção para linfócitos T CD8+ no tecido sinovial.....	38
Figura 12 - Imunomarcção para linfócitos B CD20+ no tecido sinovial.....	39
Figura 13 - Imunomarcção para macrófagos CD68+ no tecido sinovial	40
Figura 14 - Imunomarcção para FoxP3+ no tecido sinovial.....	41
Figura 15 - Imunomarcção para Caspase 3 no tecido sinovial	42
Figura 16 - Imunomarcção para IL-10+ no tecido sinovial.....	43
Figura 17 - Imunofluorescência para colágeno do tipo I no tecido sinovial	45
Figura 18 - Imunofluorescência para colágeno do tipo III no tecido sinovial ...	46
Figura 19 - Imunofluorescência para colágeno do tipo V no tecido sinovial	47
Figura 20 - Colocalização para colágeno V e IL-10 no tecido sinovial	49
Figura 21 - Colocalização para FoxP3 e IL-10 e no tecido sinovial	50
Figura 22 - Colocalização para CD3 e Caspase 3 no tecido sinovial	51

Figura 23 - Pesquisa de anticorpos anticolágeno tipo II e V no soro..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escore de <i>Krenn</i> para camada de revestimento sinovial	20
Tabela 2 - Escore de <i>Krenn</i> para densidade de células	20
Tabela 3 - Escore de <i>Krenn</i> para infiltrado inflamatório	21
Tabela 4 - Escore de <i>Krenn</i> para graus de sinovite	21

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACF	Adjuvante completo de <i>Freund</i>
AI	Artrite induzida
AI-Col V	Artrite induzida tratado com colágeno V
APCs	Células apresentadoras de antígenos
Aps	Artrite psoriática
AR	Artrite reumatóide
Breg	Linfócito B regulatório
BSA	Albumina bovina sérica
C1q	Componente do complemento 1q
CC	Caulim e carragenina
CCR7	Quimiocina 7
CCR9	Quimiocina 9
CD103+	Células dendríticas
CD20+	Linfócitos B
CD3+	Linfócitos T CD3+
CD4+	Linfócitos T CD4+
CD5+	Linfócito B CD5+
CD68+	Macrófagos
CD8+	Linfócitos T CD8+
CD8+	Linfócitos T CD8+
Células M	Células microfenestradas
CT-Col V	Controle tratado com colágeno V
CX3CR1+	Células dendríticas
DA	Diâmetro articular
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FAN	Fator antinuclear
Fc	Fragmento cristalizável
FoxP3+	Fator de transcrição nuclear P3+
g	Grama
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino

H&E	Hematoxilina-eosina
IAM	Iodo-acetato monossódico
IDO	Enzima indoleamina 2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IL-17	Interleucina 17
IL-1beta	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
ITO	Imunoterapia oral
M	Molar
mM	Milimolar
mBSA	Albumina sérica bovina metilada
mCi	Milicurie
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MMP-7	Matriz metaloprotease 7
N	Normal
NH₃	Amina terminal
nm	Namômetro
OA	Osteoartrite
PBS	Tampão fosfato-salino
PET/CT	Tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada
pH	Potencial hidrogeniônico
pNPP	p-nitrofenil fosfato
rpm	Rotação por minuto
Sci-70	Anti-topoisomerase I
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
SVNP	Sinovite vilonodular pigmentada
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta

Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Células T regulatórias
μg	Micrograma
μl	Microlitro
vs	Versus
x	Vezes
$\alpha\text{1(V)}$	Cadeia alfa 1 do colágeno V
$\alpha\text{2(V)}$	Cadeia alfa 2 do colágeno V
$\alpha\text{3(V)}$	Cadeia alfa 3 do colágeno V
$\alpha\text{4}\beta\text{7}$	Integrina
$[\text{18F}]\text{FDG}$	(18F) fluorodeoxiglicose
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
<	Menor
\pm	Mais-menos
%	Percentual

RESUMO

Silveira LKR. Efeito da imunoterapia com colágeno V no processo inflamatório e remodelamento do tecido sinovial na artrite experimental [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Recentemente, muitos autores demonstraram que a lesão tecidual e vascular decorrente de processos inflamatórios patológicos pode expor o colágeno V, proteína fibrilar localizada no interior das fibrilas de colágeno. Assim, pelas suas propriedades antigênicas, o colágeno V pode tornar-se um neoantígeno, quando exposto ao sistema imunológico, gerando autoimunidade em diversas enfermidades. Estudos prévios do nosso grupo, mostraram que ratos com inflamação articular induzida por albumina sérica bovina metilada (mBSA) e adjuvante completo de *Freund*, apresentam anticorpos anti-colágeno V. Ainda, a administração oral profilática com colágeno V, interferiu positivamente na modulação do processo inflamatório e remodelamento da sinóvia nos ratos com inflamação articular; entretanto, o efeito do colágeno V como imunoterápico ainda não é conhecido. No presente estudo, avaliamos o efeito da imunoterapia com colágeno V, após o estabelecimento da sinovite articular em modelo de artrite em ratos. Para isso, vinte e cinco ratos da linhagem *Lewis*, machos, três meses de idade, com média de peso de 360g foram divididos em três grupos: artrite induzida (AI, n=10), artrite tratada com colágeno V (AI-Col V, n=10) e controle com colágeno V (CT-Col V, n=5). A artrite foi induzida através de injeção intra-articular (ia) de mBSA e adjuvante completo de *Freund* no joelho direito, com reforços intra-articulares de mBSA no 7º e 14º dias. No 15º dia, após o período de indução, o grupo AI-Col V recebeu administração oral de 300 µl de uma solução de 1,6µg/µl de colágeno V, três vezes por semana. No grupo CT-Col V foi injetado 20 µl de solução salina (ia), e os animais receberam o mesmo protocolo de tratamento do grupo AI-Col V. Os grupos foram eutanasiados após 30 dias da primeira injeção. Foram avaliados o diâmetro articular, inflamação por PET/CT com [18F]FDG, expressão de CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, FoxP3+, Caspase 3+ e IL-10+ e do colágeno dos tipos I, III e V, além da pesquisa de anticorpos anti-colágeno II e V no soro. Nossos resultados mostraram aumento no diâmetro articular em 7 e 14 dias nos grupos AI e AI-Col V e diminuição aos 30 dias. Ainda, não foi detectado diferença significativa da atividade metabólica celular entre os grupos AI-Col V e AI, após 30 dias. Morfologicamente, identificamos espessamento da membrana sinovial, presença de intenso infiltrado inflamatório no tecido sinovial do grupo AI; ao contrário, identificamos tênue diminuição de células inflamatórias, associadas ao depósito de colágeno no grupo AI-Col V. Nos grupos AI e AI-Col V, identificamos aumento de linfócitos T (CD3+, CD4+, CD8+), linfócitos B (CD20+) e macrófagos (CD68+) no tecido sinovial do joelho direito com indução de artrite, em relação ao joelho esquerdo. Ressaltamos, intenso infiltrado de linfócitos marcados duplamente para FoxP3+

e IL-10+ e, também, de linfócitos CD3+ com caspase 3+ no tecido sinovial do grupo AI-Col V, quando comparado ao tecido sinovial do grupo AI. Adicionalmente, o tecido sinovial do grupo AI-Col V apresentou diminuição da expressão de colágeno V nas regiões com intensa positividade para IL-10, quando comparado ao grupo AI. No grupo AI-Col V também identificamos um aumento significativo de colágeno I e diminuição de colágeno V, o que não foi observado para o colágeno III. Quanto à frequência de anticorpos no soro, encontramos anti-colágeno II, em 50% e 46,6% dos animais, respectivamente nos grupos AI e AI-Col V, e anti-colágeno V em 50% e 58,3% dos animais, respectivamente em AI e AI-Col V. Sabendo-se que a administração oral de colágeno V, aos 15 dias da indução da artrite em ratos, induziu aumento de linfócitos FoxP3+ com intensa produção de IL-10+, aliada ao aumento de colágeno I e diminuição de colágeno V, podemos concluir que o colágeno V tem efeito imunoterápico na artrite em ratos. Ainda, sugerimos que anticorpos anti-colágeno V poderiam ser utilizados como um biomarcador de evolução do processo inflamatório articular nesta enfermidade.

Palavras-chave: Sinovite. Artrite. Colágeno. Colágeno V. Imunoterapia. Tolerância.

ABSTRACT

Silveira, LKR. Effect of collagen V immunotherapy on the inflammatory process and synovial tissue remodeling in experimental arthritis [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Recently, many authors have suggested that tissue and vascular damage resulting from pathological inflammatory processes can expose collagen V, a fibrillar protein located within collagen fibrils. Thus, due to its antigenic properties, collagen V can become a neoantigen when exposed to the immune system, generating autoimmunity in several diseases. Previous studies by our group have shown that rats with joint inflammation induced by methylated bovine serum albumin (mBSA) and complete Freund's adjuvant, have anti-collagen V antibodies. Furthermore, prophylactic oral administration with collagen V, positively interfered in the modulation of the process inflammation and synovial remodeling in rats with joint inflammation; however, the effect of collagen V as an immunotherapy is not yet known. In the present study, we evaluated the effect of immunotherapy with collagen V after the establishment of joint synovitis in a model of arthritis in rats. For this, twenty-five male Lewis rats, three months old, with an average weight of 360g were divided into three groups: induced arthritis (IA, n=10), arthritis treated with collagen V (IA-Col V, n=10) and control with collagen V (CT-Col V, n=5). Arthritis was induced by intra-articular (ai) injection of mBSA and complete Freund's adjuvant in the right knee, with intra-articular mBSA boosters on the 7th and 14th days. On the 15th day, after the induction period, the IA-Col V group received oral administration of 300 µl of a 1.6 µg/µl collagen V solution, three times a week. In the CT-Col V group, 20 µl of saline solution (ai) was injected, and the animals received the same treatment protocol as in the IA-Col V group. The groups were euthanized 30 days after the first injection. Joint diameter, inflammation by PET/CT with [18F]FDG, expression of CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, FoxP3+, Caspase 3+ and IL-10+ and collagen types I, III and V, in addition to search for anti-collagen II and V antibodies in serum. Our results showed an increase in joint diameter at 7 and 14 days in the IA and IA-Col V groups and a decrease at 30 days. Still, no significant difference was detected in cellular metabolic activity between the IA-Col V and IA groups after 30 days. Morphologically, we identified thickening of the synovial membrane, presence of intense inflammatory infiltrate in the synovial tissue of the IA group; on the contrary, we identified a slight decrease in inflammatory cells associated with collagen deposition in the IA-Col V group. In the IA and IA-Col V groups, we identified an increase in T lymphocytes (CD3+, CD4+, CD8+), B lymphocytes (CD20+) and macrophages (CD68+) in the synovial tissue of the right knee with arthritis induction, compared to the left knee. We highlight the intense infiltration of lymphocytes doubly labeled for FoxP3+ and IL-10+, and also of CD3+ lymphocytes with caspase 3+ in the synovial tissue of the IA-Col V group, when compared to the synovial tissue of the IA group. Additionally, the synovial tissue of the IA-Col V group showed a decrease in collagen V expression in regions with intense positivity for IL-10, when compared to the IA group. In the IA-Col V group, we also identified a significant increase in collagen I and a decrease in collagen V, which was not observed for collagen III. Regarding the

frequency of antibodies in the serum, we found anti-collagen II in 50% and 46.6% of the animals, respectively in the IA and IA-Col V groups, and anti-collagen V in 50% and 58.3% of the animals, respectively in IA and IA-Col V. Knowing that the oral administration of collagen V, 15 days after the induction of arthritis in rats, induced an increase in FoxP3+ lymphocytes with intense production of IL-10+, combined with an increase in collagen I and a decrease in collagen V, we can conclude that collagen V has an immunotherapeutic effect on arthritis in rats. Furthermore, we suggest that anti-collagen V antibodies could be used as a biomarker of the evolution of the joint inflammatory process in this disease.

Keywords: Synovitis. Arthritis. Collagen. Collagen V. Immunotherapy. Tolerance.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Sinovite

As articulações sinoviais são componentes de grande importância para o sistema músculo-esquelético, pois são responsáveis pelo suporte para os ossos e principalmente pela flexibilidade da articulação. Estas articulações estão presentes nos joelhos, ombros, quadris, cotovelos e falanges e são compostas por osso, tendões, cartilagem, sinóvia e espaço intra-articular, que contém o líquido sinovial (1,2).

As articulações sinoviais são propensas a danos causados por doenças ou lesões (1), sendo o tecido sinovial envolvido no início e desenvolvimento de várias doenças articulares, sejam inflamatórias, degenerativas ou artropatias microcristalinas (3).

A sinóvia encapsula as articulações diartrodiais, permitindo o movimento flexível das estruturas adjacentes, além de possibilitar o transporte seletivo de moléculas e fluidos para dentro e fora no espaço articular, lubrificar a cartilagem, nutrir os condrócitos e absorver resíduos metabólicos (1,4,5). O tecido sinovial possui um fino revestimento de células, com 50 µm de espessura, que compõe a membrana sinovial. Este tecido não possui lâmina basal e é dividido morfológicamente em camada íntima e subíntima (1,2,5). A íntima é composta por uma a duas camadas de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, também conhecidas como sinoviócitos do tipo B. Estas células têm por função principal produzir os componentes da matriz extracelular (MEC) e enzimas, como metaloproteases, que degradam estes componentes da MEC, quando necessário, para manter o equilíbrio fisiológico. Os sinoviócitos do tipo B também secretam o líquido sinovial, que se encontra no espaço articular, composto por ácido hialurônico e proteoglicano 4, permitindo a lubrificação e movimento da articulação, além de facilitar o transporte de macromoléculas e servir como reservatório para nutrientes e moléculas de sinalização (1,2,5). Ainda, estão presentes poucos sinoviócitos semelhantes a macrófagos, conhecidos como sinoviócitos do tipo A, com função fagocítica (2,4). A camada subíntima da sinóvia consiste de uma rede de tecido conjuntivo frouxo de MEC, composta por

colágeno dos tipos I, III, V e VI, sulfatos de condroitina e heparan, fibronectina e laminina, além de vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas, alguns fibroblastos e macrófagos ou linfócitos, e adipócitos (1,4,5).

O tecido sinovial é suscetível a vários distúrbios patológicos, sejam inflamatórios, como as artrites reumatóide, psoriática, reativa e séptica, ou não inflamatórios, como osteoartrite, sinovite pós-traumática e sinovite vilonodular pigmentada, que afetam principalmente a articulação do joelho, podendo ser um processo monoarticular ou poliarticular sistêmico. Os danos articulares são comumente caracterizados por aumento do fluxo sanguíneo, edema, remodelamento da MEC, derrame de líquido sinovial no espaço intra-articular, prosseguindo para hiperplasia e/ou hipertrofia da sinóvia, causada por aumento de infiltrado celular, invadindo o espaço articular (*pannus*), e em fases mais tardias pode progredir para fibrose, sendo um processo envolvido no início e durante o desenvolvimento de várias doenças articulares, como mencionamos no início deste tópico (6,7).

Na artrite reumatóide (AR), doença autoimune e crônica (8,9), caracterizada por hiperplasia da camada íntima da sinóvia e angiogênese de forma desordenada, apresenta migração de células para o tecido, transformando a sinóvia em um *pannus* que pode invadir a cartilagem e osso. O infiltrado inflamatório é composto por linfócitos T (predominantemente CD4+ e CD8+) e B formando agregados ao redor de vasos, além de infiltrado de plasmócitos, macrófagos (CD68+), neutrófilos, células dendríticas e *natural killer* (4,10,11). Claramente, a composição da sinóvia é alterada extremamente e estudos indicam que os sinoviócitos do tipo B desempenham um papel importante na alteração da inflamação aguda para a crônica (2,10). Estes sinoviócitos se expandem em grande quantidade, levando ao remodelamento da MEC, e formam vilosidades no tecido, podendo invadir e causar danos à cartilagem e osso (4). Além disso, os sinoviócitos do tipo B sofrem alteração e são ativados mediante a infiltrado celular e citocinas pro-inflamatórias. Uma vez ativados, estes sinoviócitos são capazes de produzir fatores inflamatórios, fatores de crescimento e angiogênese, que perpetuam a sinovite (2).

Outra enfermidade reumática inflamatória e crônica é a artrite psoriática (APs), com características clínicas heterogêneas, afeta pacientes com psoríase.

Esta enfermidade causa danos às articulações, coluna vertebral e enteses. A maioria dos pacientes apresentam sinovite mono ou poliarticular (12,13), caracterizada por menor hiperplasia da camada sinovial e menos monócitos e macrófagos, em estudos comparativos com a AR. Ainda, há infiltrado de linfócitos T, agregados linfóides, angiogênese e superexpressão de citocinas pró-inflamatórias (12).

Ainda, temos as artrites infecciosa ou séptica, reativa ou inflamatória, nas formas aguda ou crônica, que são causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas, podendo ser desencadeadas por diferentes fatores, como doenças pré-existentes, traumas ou cirurgias, abuso de drogas intravenosas, idade, entre outros. O acometimento ocorre de forma monoarticular na maioria dos pacientes, porém a forma poliarticular pode ser apresentada. Como o tecido sinovial não possui lâmina basal e é muito vascularizado, é um ambiente favorável para a proliferação destes microorganismos causadores da doença, levando à inflamação, edema, isquemia tecidual e vasos dilatados. As enzimas e toxinas bacterianas também causam danos à cartilagem, metaloproteases ativadas por citocinas levam à digestão tecidual e a isquemia da sinóvia, levando à anóxia da cartilagem (14,15).

No caso da osteoartrite (OA), artropatia crônica mais comum em pacientes idosos, que afeta principalmente os joelhos. A etiopatogenia não é bem conhecida, mas sabe-se que um dos fatores de risco para o desenvolvimento da OA é a sobrecarga articular, como por exemplo o excesso de peso, vícios posturais, desalinhamento articular, prática inadequada de esportes e trauma articular. Nesta doença, não apenas a cartilagem é acometida, mas também o osso subcondral, tecido sinovial, ligamentos, meniscos e cápsula articular; tendo a sinóvia um papel importante na patogênese da doença. A OA causa hiperplasia da camada de revestimento da sinóvia, espessamento, fibrose e vascularização estromal. Ocorre infiltrado celular, predominantemente de macrófagos, que se agregam e formam células gigantes multinucleadas, e linfócitos T. Os macrófagos, sinoviócitos e condrócitos levam à um ciclo vicioso ao produzirem mediadores pró-inflamatórios, que aumentam o infiltrado celular, angiogênese, causando ainda mais degradação da cartilagem e osso subcondral, que conseqüentemente resulta em mais inflamação sinovial

(3,6,16,17).

Finalmente, podemos citar a sinovite vilonodular pigmentada, (SVNP), uma doença rara e idiopática, que se desenvolve na bursa e nas bainhas dos tendões, geralmente apresentada de forma monoarticular, afetando principalmente os joelhos. A SVNP é caracterizada por um processo de proliferação sinovial benigno dentro das articulações, infiltrado de células gigantes multinucleadas e histiócitos, com deposição de pigmento hemossiderina (produto de degradação de hemácias) (3,6,7).

A sinovite também pode ser causada por lesões agudas, caracterizada por vasos dilatados, edema, inflamação e espessamento sinovial. Lesões contínuas podem levar a aderências e fibrose, e até destruição articular, sendo de extrema importância sua análise, assim como formas de intervir neste processo tão doloroso para o paciente (7).

1.2- Modelos Experimentais

Dada a ocorrência da inflamação sinovial em muitas doenças articulares, diversos estudos têm buscado métodos para uma melhor terapêutica, através de ensaios e modelos experimentais. Estes modelos foram desenvolvidos principalmente em camundongos e ratos, com a finalidade de compreender os mecanismos envolvidos nas patologias articulares e avaliação das estruturas fundamentais da articulação, para o desenvolvimento de novos fármacos e apoio diagnóstico (18,19).

A indução de modelos de artrite em uma única articulação (monoarticular) é vantajosa, pois diminui o possível sofrimento animal, ao reduzir a gravidade da doença, permite um estudo mais refinado sem as complicações da doença sistêmica e, ainda, é possível utilizar o lado contralateral como controle (20).

Um modelo clássico de monoartrite é o induzido por adjuvante completo de *Freund* (ACF), um óleo mineral que contém *Mycobacterium tuberculosis* inativa, em ratos ou camundongos por via intra-articular, podendo ser usada a articulação tibiotársica ou femorotibial. Histologicamente, é observado edema, infiltrado inflamatório na sinóvia e espaço articular, hiperplasia sinovial, *pannus* e danos à cartilagem. Neste modelo, a inflamação articular pode persistir por até

28 dias (20–23).

A monoartrite também pode ser induzida por caulim e carragenina (CC) em camundongos ou ratos. O caulim é uma substância inorgânica, constituída de silicato de alumínio hidratado, que causa danos à cartilagem e sinóvia. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado, proveniente de uma espécie de musgo, que causa infiltração leucocitária local e liberação de mediadores celulares (24). A injeção destes dois componentes no espaço intra-articular (joelho ou tornozelo), gera inflamação articular e sinovial, por infiltrado celular, exsudato do líquido sinovial, destruição da cartilagem e aumento do fluxo sanguíneo. Este modelo de monoartrite pode ser mantido por até 10 dias (25–27).

Outro modelo de monoartrite é o induzido pela injeção de iodo-acetato monossódico (IAM), nas articulações do joelho ou tíbio-társica em ratos. Após a injeção intra-articular de IAM, observa-se inchaço na articulação, erosão da cartilagem e osso subcondral, inflamação e hiperplasia sinovial. Este modelo persiste por até 28 dias (28,29).

Ainda, o Zymozan, um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, quando injetado por via intra-articular no joelho de ratos ou camundongos, induz inflamação sinovial, com infiltrado de neutrófilos, edema e aumento da permeabilidade vascular na fase aguda. E na fase crônica induz infiltrado linfocitário e de macrófagos, produção de citocinas pró-inflamatórias e *pannus*. Este modelo tem pico inflamatório no 3º dia, e regressão a partir do 7º dia (19,30–32).

Entre estes modelos, destaca-se a artrite induzida em ratos por antígeno (AIA), com albumina bovina sérica metilada (mBSA). Este modelo é dependente de células T CD4+ e só afeta as articulações injetadas. A injeção intra-articular da mBSA emulsificada em ACF no joelho, seguido de reforços do mesmo antígeno, resulta em inchaço da articulação, hiperplasia sinovial, infiltrado celular e *pannus*, semelhantes aos achados histopatológicos de pacientes com AR. E a mBSA por ser uma proteína catiônica, fica retida em locais inflamatórios e se liga à cartilagem, causando erosão do tecido (33–36).

1.3- Colágeno tipo V no tecido sinovial

Como mencionamos anteriormente a membrana sinovial é constituída por uma camada de células e que está associada a uma matriz fibrilar fina ou amorfa formada por um tecido conjuntivo frouxo relativamente rico em colágeno e outras macromoléculas. Entre estas macromoléculas destaca-se o colágeno tipo V que é uma glicoproteína pertencente ao grupo dos tipos de colágeno fibrilares e que apresenta propriedades imunogênicas, antigênicas e pelo potencial de tornar-se um autoantígeno quando exposto, pela ação de metaloproteases ou outros agentes indutores da lesão endotelial crônica, como nas sinovites (37).

Embora seja quantitativamente minoritário em relação a outros tipos de colágeno, cerca de 2 a 5 %, o colágeno V possui ampla distribuição, localizado principalmente entre a membrana basal e o tecido conjuntivo adjacente, em tecidos como o pulmão, pele, baço, córnea, fígado, sinóvia, entre outros. Este colágeno possui três isoformas: $[\alpha 1(V), \alpha 2(V) \text{ e } \alpha 3(V)]$, constituída por três cadeias α distintas; $[\alpha 1(V)_2, \alpha 2(V)]$, formada por duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$, e $[\alpha 1(V)_3]$, que possui três cadeias $\alpha 1$ idênticas. Entre as isoformas do colágeno V, a $[\alpha 1(V)_2, \alpha 2(V)]$ é a mais comum e presente na maioria dos tecidos (38–42). Adicionalmente, o colágeno V é uma proteína extremamente conservada entre as espécies e se copolimeriza com os tipos I e III para formar fibrilas heterotípicas (I/III/V). A porção tripla hélice helicoidal (fibrilar) da molécula de colágeno V encontra-se oculta no interior destas fibrilas, sendo o domínio globular amina terminal ($-\text{NH}_3$) da cadeia $\alpha 1$ projetado para a superfície (43,44). Este domínio globular regula o crescimento fibrilar das fibrilas heterotípicas, impedindo fisicamente que novos monômeros se acrescentem à fibrila. Devido a esta característica o colágeno V tem função importante na organização, crescimento e dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas, sendo atualmente considerado o nucleador da fibrilogênese do colágeno tipo I (45–50).

Este colágeno foi considerado um dos responsáveis pela autoimunidade em patologias como a bronquiolite obliterante, decorrente de transplante de pulmão em modelo murino e em humanos, fibrose pulmonar idiopática, aterosclerose e em asma de hipersensibilidade; e, ao contrário, a indução de tolerância oral/nasal com o colágeno V preveniu o desencadeamento dos

processos patológicos em modelos experimentais destas doenças (45,51–58). Mais recentemente, Wilkes et al., 2015 (57) demonstraram que pacientes com fibrose pulmonar idiopática submetidos a imunoterapia oral com doses de 1,0 mg de colágeno V, diariamente por 30 dias, tiveram uma estabilização da função pulmonar, de matriz metaloprotease 7 (MMP-7) e redução na ligação de C1q para anticorpos anticolágeno V (57).

Adicionalmente, estudos do nosso grupo demonstram que coelhos e camundongos C57BL/6 imunizados com colágeno V apresentam alterações semelhantes a esclerose sistêmica, caracterizadas por fibrose de pele e pulmão, vasculopatia e autoanticorpos, como Fator antinuclear (FAN), antitopoisomerase-I (Scl-70) e anticolágeno I, III e IV, bem como imunocomplexos. Neste modelo de esclerose sistêmica foi sugerido que o depósito de imunocomplexos circulantes (colágeno V-anticolágeno V) na superfície endotelial, provavelmente lesa o endotélio expondo o colágeno tipo V presente na membrana basal, anteriormente oculto, o qual atuaria como neoantígeno, contribuindo para a perpetuação do processo inflamatório e caracterizando autoimunidade (59–61).

Estudos anteriores demonstraram a presença de anticorpos anticolágeno V no soro de pacientes com diferentes doenças reumáticas, com prevalência na artrite reumatoide (62). Ainda, em um estudo mais recente de Atayde et al., 2018 foi observada positividade para anticorpos anticolágeno V no soro de ratos com artrite induzida por mBSA (34).

Embora o colágeno V seja um dos constituintes do tecido sinovial, até o momento, não existem muitos relatos na literatura científica em relação à sua importância no processo de sinovite. Acreditamos que com o remodelamento tecidual, decorrente do processo inflamatório e ação de metaloproteases, epítomos do colágeno V possam ser expostos tornando-se antígenos em potencial. Neste aspecto, a administração de colágeno V, por via oral, pode resultar na exposição de peptídeos imunogênicos para o sistema imune do intestino e consequente ativação de mecanismos de tolerância oral (63,64).

1.4- Tolerância oral

A tolerância oral é definida como supressão da resposta imunológica celular e/ou humoral a um antígeno pela prévia administração deste pela via oral. O objetivo deste tipo de tolerância é o de suprimir a reatividade imune específica sem afetar o sistema imunológico como um todo, através da deleção ou inativação de clones de células T direcionados a estes antígenos específicos (65).

Os antígenos administrados oralmente encontram o tecido linfóide associado ao intestino (GALT; *gut-associated lymphoid tissue*), constituído principalmente pelas placas de Peyer, a lâmina própria do intestino e os nódulos linfáticos mesentéricos (Figura 1) (66). Após ingestão e processo digestivo, os antígenos solúveis presentes no lúmen intestinal são absorvidos e transportados através das células epiteliais intestinais, por meio de complexos mecanismos, como: difusão paracelular; endocitose por células *goblet* e por células M (*microfold*), presentes nas placas de Peyer, e englobamento transepitelial de antígenos do lúmen por células dendríticas CX3CR1+. Nas placas de Peyer e em outras regiões da lâmina própria, células dendríticas CD103+ englobam estes antígenos e migram para os nódulos linfáticos mesentéricos, através de um mecanismo dependente de receptores de quimiocina 7 (CCR7) (66–68). Nos nódulos linfáticos mesentéricos, as células dendríticas CD103+ induzem a diferenciação de células T nativas, específicas para o antígeno, em células T regulatórias (Tregs), através de mecanismos dependentes de TGF- β e ácido retinóico. O ácido retinóico aumenta a expressão do receptor de quimiocina (CCR9) e integrina $\alpha 4\beta 7$ nas células Tregs recém diferenciadas, os quais induzem o processo de migração destas células para a lâmina própria do intestino. Ainda, as células dendríticas CD103+ expressam altos níveis da enzima *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO). Essa enzima cataboliza o triptofano e produz moléculas imurreguladoras, as quinureninas, desencadeando um ambiente imunossupressor, caracterizado por anergia de células T efectoras, e indução na diferenciação de células T *naive* em células Tregs que expressam fator de transcrição FoxP3+ (66–70). A migração das células Tregs, específicas para o antígeno, dos nódulos linfáticos periféricos para a lâmina própria do

intestino é fundamental para o sucesso da tolerância oral. Na lâmina própria, ocorre a expansão clonal de células Tregs, pela ação da IL-10, produzida pelas células dendríticas CX3CR1+ (Figura 1). Embora as Tregs específicas para o antígeno, induzidas por tolerância oral, sejam formadas e localizadas no intestino, elas podem também ser encontradas na circulação para manter a tolerância sistêmica, através da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e TGF- β (66–68).

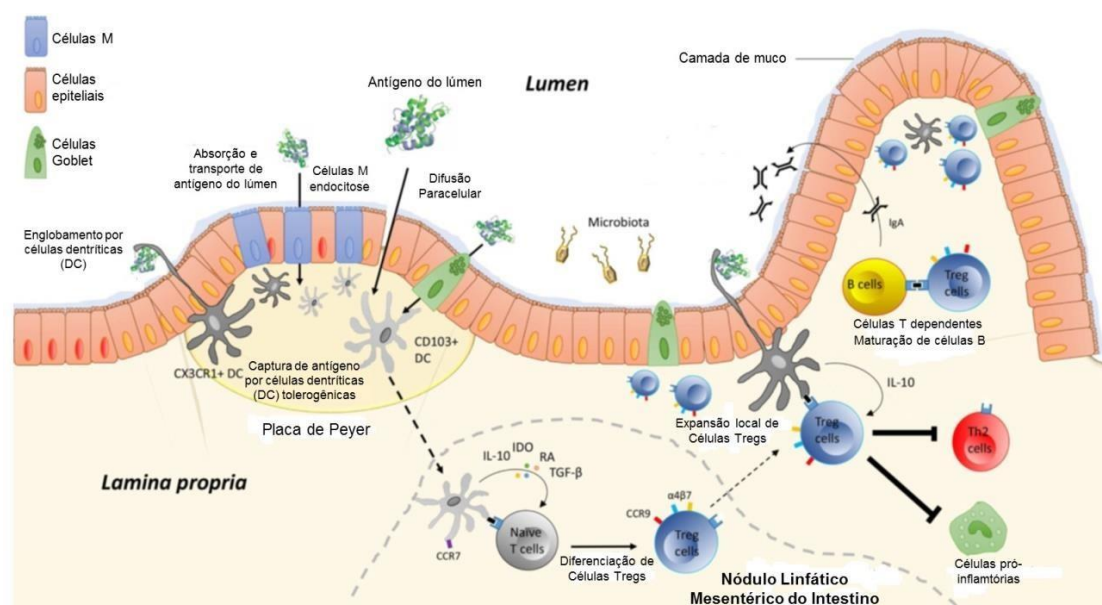


Figura 1 - Desenho esquemático mostrando as etapas dos mecanismos envolvidos na indução e manutenção da tolerância oral. Após a ingestão e digestão, os antígenos presentes no lúmen são absorvidos e transportados através das células epiteliais do intestino, deste modo possibilitando a apresentação antigênica para as células imunes locais. Este processo complexo pode incluir: 1) difusão paracelular; 2) endocitose via células *microfold* (M) e células *goblet*, e 3) englobamento transepitelial do antígeno do lúmen por células dendríticas (CDs). Nas placas de Peyer, os antígenos do lúmen são capturados por CDsCD11c+CD103+ ou CDsCD11b+CX3CR1+. As células CD103+ migram para os nódulos linfáticos periféricos em um mecanismo dependente de CCR-7 para promover a diferenciação das células T *naive* em células Tregs. Depois de sua geração nos nódulos linfáticos, as Tregs aumentam a expressão de CCR9 e integrina $\alpha 4\beta 7$ e migram para a lâmina própria, onde ocorre a expansão clonal local para induzir tolerância oral. *Adaptado de Erik Wambre e David Jeong, 2018.*

O conceito imunoterapia oral (ITO) tem sido usado recentemente para definir a administração de um antígeno por via oral, para suprimir respostas inflamatórias através da ativação de mecanismos imunorregulatórios. Podem ser administrados como ITO moléculas inespecíficas, como IL-10, ou anticorpos monoclonais, como o anti-CD3, que induzem a produção de células Tregs. Ainda, para a ITO podem ser administrados os antígenos-alvo, específicos para modular a inflamação. E quando as moléculas inespecíficas estão associadas

com antígenos específicos, o efeito da tolerância oral é potencializado (71,72).

Apesar do antígeno-alvo ser desconhecido em muitas doenças, a ITO de um antígeno pode desencadear efeitos indiretos de supressão, pois os mecanismos imunorregulatórios são disseminados no ambiente inflamatório (72).

As células Tregs CD4+CD25+FoxP3+ específicas para o antígeno, induzidas pela tolerância periférica, parecem ser necessárias para a tolerância oral (67). Outras subpopulações de células Tregs foram descritas, incluindo as células Th3 e Tr1 (65). As Th3 expressam TGF- β e o marcador de superfície LAP (*latencyactivated peptide*) e as Tr1 suprimem a resposta imune, através da produção de IL-10 (67,68). Foi descrita uma plasticidade entre as subclasses de células Tregs e acredita-se que a natureza do antígeno, ou modelo usado nos estudos experimentais, possa determinar o fenótipo das células Tregs (67).

Classicamente, a tolerância imunológica induzida pela via da mucosa oral tem sido descrita como um processo multifacetado envolvendo mecanismos de deleção clonal ou apoptose, anergia de células T reativas, específicas para o antígeno, e regulação ativa por células Tregs (66). Foi sugerido que estes mecanismos são determinados pelo regime de administração do antígeno, onde simples doses altas de antígeno favorecem deleção ou anergia clonal, enquanto múltiplas doses baixas de antígeno estão ligadas com a supressão mediada por células Tregs (68,73). Entretanto, sabe-se que esses mecanismos não são mutuamente exclusivos e que as células Tregs FoxP3+, especialmente as induzidas de células T convencionais na periferia (pTregs), tem um papel dominante na imunossupressão.

O microambiente do GALT favorece o desenvolvimento da tolerância imunológica periférica, pela presença de células dendríticas tolerogênicas, que produzem altos níveis de IL-10 e TGF- β , além de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido retinóico e transcrição do FoxP3, entre outros fatores. Neste aspecto, nas últimas décadas vários estudos têm mostrado que a administração oral de antígenos suprime vários modelos animais de doenças autoimunes, incluindo encefalomielite autoimune experimental, uveíte, tireoidite, miastenia, artrite e diabetes, e também condições inflamatórias não-autoimunes, como asma, aterosclerose, rejeição de enxertos, alergias e derrames (68).

A tolerância pela via das mucosas periféricas no tratamento de AR experimental e em humanos tem sido vastamente estudada. Nos últimos anos, estudos mostram que a tolerância oral com colágeno tipo II produz efeitos terapêuticos em modelos experimentais de artrite induzida por colágeno, através da diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-2, IL-17) e aumento na produção de mediadores anti-inflamatórios (IL-4, TGF- β) (74). Foi mostrado que a tolerância oral com ovalbumina, de modo profilático, e após a indução de modelo de artrite, por imunização com colágeno tipo II e ovalbumina, mudou o curso da doença pelo aumento de células FoxP3+ e IL-10 e diminuição de células IFN- γ + e IL-17+; e além disso, a transferência adotiva de células dendríticas antes da indução deste modelo de artrite mimetizou os efeitos da tolerância oral (75). A administração oral de colágeno II também se mostrou eficiente na supressão de AR induzida por adjuvante completo de *Freund* em ratos (76). Ainda, em trabalho realizado pelo nosso grupo, a administração oral com colágeno V, concomitante à indução de artrite em joelho de ratos pela injeção de mBSA, resultou na diminuição do processo inflamatório sinovial e aumento da expressão de caspase 9, sugerindo que a administração oral de colágeno V neste modelo poderia aumentar a apoptose de células inflamatórias (34).

1.5- Justificativa

Tendo em vista que há diversas formas de artrite, que muitas das vezes têm curso extremamente severo, considera-se que os tratamentos precisam ter início cada vez mais precoce, a fim de preservar a estrutura osteocartilaginosa e conseqüentemente as funções articulares do paciente. Neste cenário, como já mencionado o comprometimento sinovial tem um papel relevante no processo de degradação dos componentes articulares e ósseos. Porém, o conhecimento sobre os mecanismos específicos que possibilitem a redução do processo inflamatório sinovial e formação do “*pannus*”, ainda permanecem desconhecidos, assim como o efeito de novas terapias.

Nos últimos anos o colágeno V tem sido considerado um antígeno sequestrado e sua importância na autoimunidade foi mostrada em vários processos patológicos (45,51–59,77–80), e a indução de tolerância oral/nasal

com o colágeno V tem se mostrado eficaz na inibição destes processos em modelos experimentais (45,51–58,60,81) e em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (57). Ainda, Parra et al., 2016 em modelo experimental de câncer de pulmão induzida por uretano, mostraram que a administração intranasal de colágeno V, induziu apoptose das células cancerígenas (81).

Recentemente, o nosso grupo mostrou que a administração profilática de colágeno V em ratos com artrite induzida por injeção intra-articular de mBSA, foi responsável pela diminuição do infiltrado inflamatório no tecido sinovial, aliado à diminuição de metaloprotease 2 (MMP 2) e aumento da expressão de caspase 9 na sinóvia. Ainda, foi encontrada diminuição na dosagem de IL-1 β , IL-17 e TNF- α sérica nos animais com artrite, submetidos à administração de colágeno V. Além disso, neste estudo os ratos com artrite induzida apresentaram anticorpos anticolágeno V no soro (34). Estes resultados podem sugerir que o remodelamento sinovial, decorrente da sinovite experimental, possa interferir na constituição e distribuição da MEC, de maneira a expor epítomos antigênicos do colágeno V, que estimulariam uma resposta celular e humoral, podendo interferir na resposta inflamatória na artrite. Entretanto, até o momento não foi avaliado a resposta celular específica para esta proteína, assim como o perfil de citocinas envolvidas neste tipo de resposta. Além disso, ainda não foi esclarecido se a administração de colágeno V em artrite experimental diminuiu o processo inflamatório sinovial, através da ativação de mecanismos de tolerância oral, com a presença de células T regulatórias e citocinas anti-inflamatórias. Ainda, se faz necessário avaliar se a administração de colágeno V, iniciada após a indução da artrite é capaz de mudar o curso do modelo experimental em ratos, induzido por mBSA.

Por fim, aliado às avaliações morfológica e morfométrica do tecido sinovial e das respostas humoral e celular, é de extrema importância a avaliação do efeito da administração de colágeno V no processo inflamatório *in vivo* no modelo de artrite, através da análise de imagens por PET/CT com [18F]FDG em pequenos animais. O conhecimento destes mecanismos de ação, podem ser de grande valia para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, baseadas na administração de colágeno V, para indução de mecanismos de tolerância oral, que podem ser importantes na modulação da inflamação articular em artrite.

OBJETIVO

2- OBJETIVO

Nossa proposta neste estudo foi avaliar a importância do colágeno V na autoimunidade no modelo de artrite, induzido com albumina sérica bovina metilada (mBSA) e adjuvante completo de *Freund* em ratos, e os possíveis mecanismos de ação envolvidos na administração de colágeno V. Para isso foram investigados:

- A modulação do processo inflamatório e remodelamento do tecido sinovial, através de marcadores celulares e teciduais;
- Apoptose de células inflamatórias por imunohistoquímica;
- Indução de células T regs e citocinas anti-inflamatórias;
- Pesquisa de anticorpos anticolágeno II e V no soro dos animais;
- Efeito da administração de colágeno V na modulação do processo inflamatório após o estabelecimento da artrite, através da análise de imagens PET/CT com [18F]FDG “*in vivo*” em pequenos animais.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados ratos Lewis (n=25), machos, com peso médio de 360 g, obtidos no Biotério de Manutenção e Experimentação da Clínica Médica da FMUSP. Os animais foram mantidos, com ciclo de 12h claro/12h escuro, à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, recebendo água filtrada e ração convencional *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP, registrada com o nº 1294/2019.

3.2- Indução da inflamação articular

A artrite foi induzida através de injeção intra-articular de 20 µl de uma emulsão de 500 µg de mBSA (Sigma Chemical, St. Louis, MO) diluída em 10 µl de solução salina, e emulsificado em 500 µl de adjuvante completo de *Freund* (Sigma Chemical, St. Louis, MO), no joelho direito dos animais. Após 7 e 14 dias foram injetados 20 µl, por via intra-articular, no mesmo joelho, de uma solução de 50 µg de mBSA em 500 µl de solução salina (AI; grupo com artrite induzida, n=20). Nos animais do grupo controle sem artrite, foi injetado 20 µl de solução salina, por via intra-articular, no joelho direito (CT-Col V; grupo controle, n=5). Todos os animais foram mantidos por um período de 30 dias. A anestesia foi administrada via intraperitoneal (xilazina 10mg/Kg e quetamina 75mg/Kg), e a analgesia foi realizada por via subcutânea com cloridrato de tramadol (40mg/Kg de peso corporal) durante 3 dias após as induções, em um intervalo de 8 em 8 horas. A eutanásia foi realizada com sobre dose anestésica, de acordo com as normas de ética em experimentação animal.

3.3- Protocolo da administração de colágeno V

Para a administração de colágeno V, os ratos foram contidos e uma sonda orogástrica metálica rígida, acoplada a uma seringa de 1mL, foi introduzida até o ponto correspondente à distância entre a boca e o apêndice xifóide dos animais.

A concentração de 500µg de colágeno V/300µl de ácido acético 0,01N foi administrado nos animais com AI (AI- Col V) e controle (CT-Col V), como segue

abaixo:

Grupo AI (n=10): Artrite induzida por mBSA/adjuvante completo de *Freund* e sem administração de colágeno V (Figura 2).

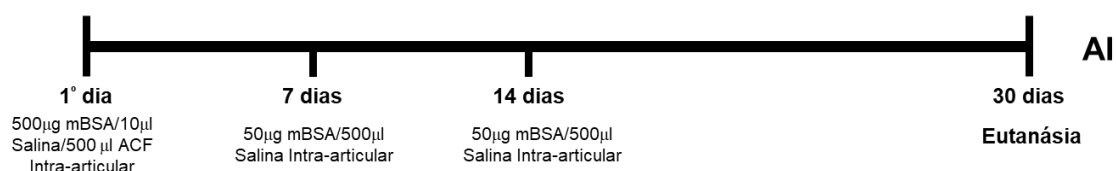


Figura 2 - Esquema de indução de artrite.

Grupo AI-Col V (n=10): Artrite induzida por mBSA/adjuvante completo de *Freund* e administração de 500µg de colágeno V, por via oral, a partir do décimo quinto dia até 30 dias após a indução de artrite, administrado 3 vezes por semana (Figura 3).



Figura 3 - Esquema de indução de artrite e administração de colágeno V, a partir do 15º dia, administrado 3 vezes por semana.

Grupo CT-Col V (n=5): Grupo controle com injeção intra-articular de solução salina e administração de 500µg de colágeno V, 3 vezes por semana, via oral, por um período de 15 dias (Figura 4).



Figura 4 - Esquema grupo controle administrado com colágeno V.

3.4- Avaliação de processo inflamatório utilizando [18F]FDG

Para avaliação *in vivo* do efeito da administração de colágeno V no processo inflamatório articular, os grupos AI e AI-Col V (n=10 animais/grupo) foram submetidos ao PET/CT nos tempos basal (um dia antes do início do protocolo), 14 (um dia antes do início da administração de colágeno V) e 30 dias (no final dos protocolos). No momento apropriado os animais, foram posicionados em equipamentos de detecção apropriados (câmaras de tomografia por emissão de pósitron – PET, ou tomografia por emissão de fóton único – SPECT) para detecção da radiação. Para este procedimento, os animais, sob efeito de anestesia com 1,5-3% isoflurano em oxigênio 100%, tiveram 18-37 MBq do radiofármaco (18F) fluorodeoxiglicose (18FDG), uma molécula marcada com isótopos radioativos, principalmente para detecção de tumores ou sistemas em que o consumo de glicose possa ser diferenciado em sistemas alvos e não alvos, administrado por injeção via veia peniana e a anestesia foi suspensa para melhor distribuição do radiofármaco. Após 45 minutos os animais foram novamente anestesiados e posicionados em equipamento imagens PET/CT (Triumph® II Trimodality System, CA, USA) (82). As imagens foram reconstruídas e processadas utilizando o algoritmo 3D-OSEM usando 20 iterações e 4 subconjuntos, e quantificadas pelo software PMOD versão 4.0.

Após a aquisição da imagem no tempo 30 dias, os animais foram novamente anestesiados e eutanasiados, de acordo com as normas de ética em experimentação animal, e a radioatividade em cada órgão e nas juntas foi determinada em contador de cintilação.

A captação de [18F]FDG é expressa em valor padronizado de captação (SUV) calculado como: $SUV = \text{concentração de radioatividade (Bq/mL)} / [\text{dose injetada (Bq)/peso do animal (g)}]$.

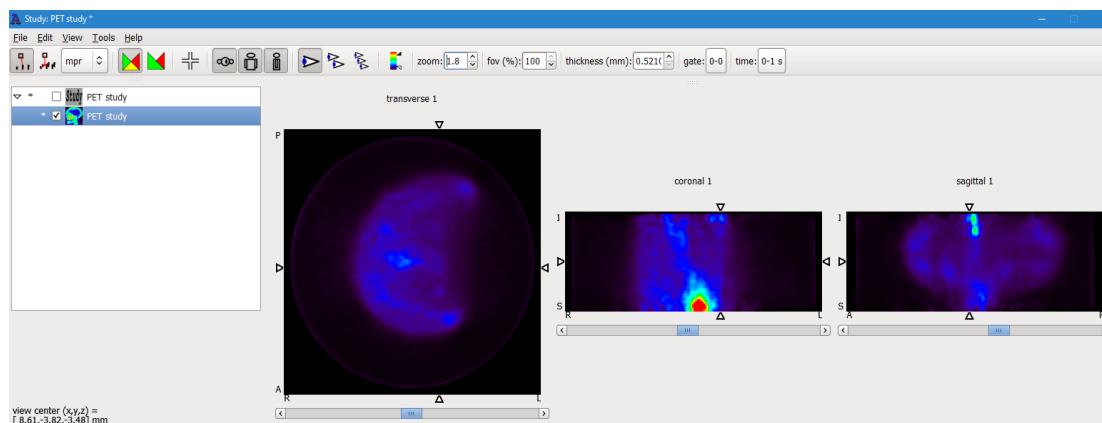


Figura 5 - Imagem representativa da análise de imagens de PET/CT pelo software AMIDE.

3.5- Mensuração do diâmetro articular

A avaliação do edema articular induzido por mBSA, foi realizada através do registro da variação do diâmetro articular mensurado nos tempos 0, 7, 14 e 30 dias. Para tal, o animal foi imobilizado gentilmente com um campo cirúrgico tendo apenas o membro posterior livre. Com o auxílio de um paquímetro milimetrado foram obtidas três medidas do diâmetro articular (DA) tíbio-femural dos joelhos direito e esquerdo. Das três, foi feita a média. Os dados são apresentados como a diferença entre cada média registrada do lado direito com o esquerdo.

3.6- Coleta das amostras

O tecido sinovial coletado para análise histológica foi fixado em formol 10%, durante aproximadamente 24 horas. Após este período, as amostras do tecido foram envolvidas por papel de seda, para garantir melhor disposição espacial, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e submetidas aos procedimentos histológicos de rotina.

3.7- Avaliação histológica

Foram realizados cortes com 4-5 μm de espessura para coloração pela hematoxilina e eosina (H&E). As amostras de tecido sinovial coradas com H&E foram analisadas em microscópio óptico para avaliação de processo inflamatório,

presença de edema e *pannus* nas regiões sinoviais e subsinoviais.

3.7.1- Escore histopatológico

Dois observadores, sem o conhecimento prévio dos casos, analisaram o tecido sinovial em um aumento de 200x, para avaliar o grau de sinovite, utilizando o escore de *Krenn* (83), que consiste em pontuar as seguintes características: camada de revestimento sinovial (Tabela 1), densidade das células residentes (Tabela 2) e infiltrado inflamatório (Tabela 3).

Tabela 1 - Escore de *Krenn* para camada de revestimento sinovial

Pontos	Camada de células de revestimento sinovial
0	As células de revestimento formam uma camada
1	As células de revestimento formam 2-3 camadas
2	As células de revestimento formam 4-5 camadas, poucas células multinucleadas podem ocorrer
3	As células de revestimento formam mais de 5 camadas, o revestimento pode estar ulcerado e podem ocorrer células multinucleadas

FONTE: Adaptado de Krenn et al., 2006 (Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis).

Tabela 2 - Escore de *Krenn* para densidade de células

Pontos	Densidade das células residentes
0	O estroma sinovial mostra celularidade normal
1	A celularidade é ligeiramente aumentada
2	A celularidade está moderadamente aumentada, podendo ocorrer células multinucleadas
3	A celularidade é muito aumentada, células gigantes multinucleadas, formação de <i>pannus</i> e granulomas reumatóides podem ocorrer

FONTE: Adaptado de Krenn et al., 2006 (Synovitis score: discrimination between chronic low-

grade and high-grade synovitis).

Tabela 3 - Escore de *Krenn* para infiltrado inflamatório

Pontos	Infiltrado inflamatório
0	Sem infiltrado inflamatório
1	Poucos linfócitos ou plasmócitos situados principalmente perivasculares
2	Numerosos linfócitos ou plasmócitos, às vezes formando agregados semelhantes a folículos
3	Infiltrado inflamatório denso em forma de faixa ou numerosos grandes agregados semelhantes a folículos

FONTE: Adaptado de Krenn et al., 2006 (Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis).

Após a pontuação em cada característica analisada, os pontos são somados e classificados, de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 - Escore de *Krenn* para graus de sinovite

Soma dos pontos	Classificação
0–1	Sem sinovite
2–4	Sinovite de grau baixo
5–9	Sinovite de grau alto

FONTE: Adaptado de Krenn et al., 2006 (Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis).

3.8- Imunohistoquímica para células inflamatórias e apoptose celular

A imunohistoquímica foi realizada para avaliação de linfócitos, macrófagos, FoxP3, caspase 3 e IL-10, através do método da biotina-estreptoavidina-peroxidase. Resumidamente, cortes de tecido sinovial de 4-5 µm

foram desparafinizadas e bloqueadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3%, com um ciclo de 4 lavagens de 5 minutos para inibir a atividade da peroxidase endógena (CD4, CD8 e CD20). Para marcar os anticorpos CD3 e FoxP3, os cortes foram bloqueados em uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% com metanol (v/v), com um ciclo de 2 lavagens de 10 minutos. Para marcar o anticorpo CD68, foi realizado um bloqueio adicional de proteínas de 5 a 10 minutos.

Os anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica foram os seguintes: anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD3 (1:1000; Dako), anti-CD4 (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-CD8 (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-CD20 (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anticorpos policlonais de coelho anti-FoxP3 (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-caspase 3 (1:4000; Novus) e anti-IL10 (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc.). A recuperação antigênica foi realizada com solução de tampão citrato pH 6,0 (CD3, CD20, FoxP3, CD68 e caspase 3) ou pH 9,0 (CD4, CD8 e IL-10) em alta temperatura, 125°C por 1 minuto, numa panela de pressão (Pascal). Os cortes foram incubados com o anticorpo primário durante a noite a 4°C. A reação foi revelada com um Kit de biotina-estreptoavidina-peroxidase, de acordo com as instruções do fabricante. A 3,3 diaminobenzidina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) foi utilizada como cromogênio. Os cortes foram contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha HE). Para controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

3.8.1- Quantificação para células inflamatórias e apoptose celular

Para quantificar as células imunomarcadas foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos, de acordo com Gundersen et al., 1988 (84), com modificações, utilizando um sistema de análise de imagem (*Image-Pro Plus 6.0*). Em resumo, o sistema de análise de imagem consiste de uma câmera fotográfica Olympus (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada), acoplada a um microscópio Olympus (Olympus BX51), a partir dos quais as imagens foram enviadas para um monitor LG, através de um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada) e transferido para um

computador (Pentium 1330 Mhz). Utilizando-se os recursos de medidas do *Image-Pro Plus 6.0* foi construído um retículo com 100 pontos, distribuídos ortogonalmente sobre a imagem adquirida. Dois observadores, sem o conhecimento prévio dos casos, avaliaram 10 campos do tecido sinovial, num aumento de 1000x. A expressão de CD3, CD4, CD8, CD20, FoxP3, caspase 3 e IL-10 foi determinada de acordo com o número de células positivas, coincidentes com os pontos do retículo em cada campo, sendo expressas como uma porcentagem de células positivas em relação ao número total de células.

3.9- Colocalização do colágeno V e marcadores celulares por imunofluorescência

Para identificar a expressão de colágeno tipo V, CD3, FoxP3, caspase 3 e IL-10, os cortes de tecido sinovial de 4 µm foram desparafinizadas e as lâminas foram imersas em xilol aquecido a 60°C, por cerca de 30 minutos, e dois banhos de 10 minutos em xilol a temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-70%), seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos, um banho em água destilada e 15 minutos em PBS, pH 7,5. Para a recuperação dos sítios antigênicos, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 ou pH 9,0 (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) e submetidos a alta temperatura, 125°C por 1 minuto, numa panela de pressão (Pascal). Ao término desta incubação, os cortes foram lavados com PBS, por três vezes de 10 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com um ciclo de 4 lavagens de 5 min com água oxigenada 0,3%, seguido de água corrente, água destilada e, por último, as lâminas foram colocadas em tampão PBS com Tween₂₀, por 5 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram incubadas, por uma noite a 4°C, com anticorpos policlonais de coelho anticolágeno do tipo V (1:600) (78), anti-FoxP3 (1:100), anti-caspase 3 (1:1800), anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD3 (1:300) e anti-IL10 (1:50) diluídos em PBS. Após este período, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS com Tween₂₀ 0,05%, por três

vezes de 10 minutos, e incubados por 60 minutos, a temperatura ambiente, com os anticorpos conjugados anti-IgG de coelho/camundongo Alexa Fluor 488 (verde) e 546 (vermelho) (Invitrogen, Life Technology), diluídos 1:200 em PBS. A marcação dos núcleos das células foi realizada pela incubação com DAPI (Abcam, Cambridge, UK) por 5 minutos. Os cortes foram novamente lavados com PBS com Tween₂₀ 0,05%, montadas com solução de glicerina tamponada e analisados em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan).

3.10- Avaliação do colágeno no tecido sinovial

3.10.1- Imunofluorescência para colágeno dos tipos I, III e V

Para a imunofluorescência do colágeno dos tipos I, III e V, os cortes de 4µm de espessura do tecido sinovial dos animais foram aderidos em lâminas, previamente tratadas com *3-aminopropiltriethoxy Silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A reação foi iniciada pela desparafinização dos cortes, através da imersão das lâminas em xilol aquecido, a 60°C, por 30 minutos, e dois banhos de 10 minutos em xilol em temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-70%), seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos e 15 minutos em PBS, pH 7,5. Para a imunomarcação do colágeno do tipo I, a exposição e recuperação de sítios antigênicos foi realizada pela imersão dos cortes em tampão citrato, pH 6 (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA), por 10 min a 95°C na panela a vapor. Para a imunomarcação do colágeno dos tipos III e V, a exposição e recuperação de sítios antigênicos foi realizada por digestão dos cortes de tecido sinovial com pepsina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 250 unidades/mg), na concentração de 8mg/500µl em ácido acético 0,5 N, por 30 minutos, a 37°C. Ao término desta incubação, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS, por três vezes de 10 minutos, e os sítios inespecíficos bloqueados com albumina bovina sérica (BSA) a 5% em PBS, durante 30 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas durante uma noite com os anticorpos policlonais de coelho

anticolágeno do tipo I (1:100; Rockland), anticolágeno do tipo III (1:100; Rockland) e anticolágeno do tipo V (1:600) (78), diluídos em solução de PBS. Após este período, os cortes foram lavados em PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubados por 1 hora com anticorpos de cabra anti-IgG de coelho ALEXA 488 (Invitrogen, Life Technologies) diluídos 1:200 em Azul de Evans 0,006%. Por fim, as lâminas foram novamente lavadas, por cinco vezes com PBS com Tween₂₀ 0,05%, montadas com solução de glicerina tamponada e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan).

3.10.2- Quantificação do colágeno dos tipos I, III e V por histomorfometria

As lâminas imunomarcadas com colágeno dos tipos I, III e V foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan) e quantificadas por um sistema de análise de imagem. O sistema que foi utilizado consiste de uma câmera CCD Sony, acoplada a um microscópio Olympus, a partir do qual as imagens são visualizadas no monitor. Através de um sistema digital inserido num computador (Pentium 4), as imagens foram processadas pelo *software Image-Pro Plus 6.0*. As amostras foram analisadas às cegas, sendo selecionados 10 campos, num aumento de 400x, para as seguintes regiões: sinovial e subsinovial. A área total do tecido analisado em cada campo foi medida pelo *software Image-Pro Plus 6.0*. O colágeno presente nos campos adquiridos foi avaliado através da seleção da tonalidade verde fluorescente, correspondente a cada colágeno marcado. A área imunomarcada foi dividida pela área total de tecido analisado e o resultado final expresso em porcentagem.

3.11- Perfil de anticorpos anticolágeno no soro

O sangue coletado por punção da veia caudal dos animais foi colocado imediatamente no gelo. Após um período de cerca de 30 minutos a 4°C, o sangue foi centrifugado a 1.500 rpm, por 10 minutos a 4°C, e o soro aliqotado foi mantido a -80°C até o momento da dosagem dos anticorpos anticolágeno II e V. Foram realizadas coletas do sangue dos animais antes e 30 dias após da

indução da artrite.

3.11.1- ELISA para anticógeno II e V

Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 50µl de colágeno dos tipos II e V (Sigma, Chemical Co; St. Louis, Missouri, USA) numa concentração de 5µg/poço em tampão bicarbonato pH 9,6, e incubadas durante a noite a 4°C. As placas foram bloqueadas com BSA 1% em PBS (Sigma, Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA) por uma hora. As amostras de soro de ratos foram diluídas 1:50 em BSA 1% em PBS com Tween₂₀ 0,05% (Sigma, Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA); duplicatas de 50µl foram adicionadas às placas de microtitulação e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubadas com 50µl do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de rato, conjugada com fosfatase alcalina; Sigma, Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA), numa diluição de 1:1000 em solução de BSA 1% em PBS com Tween₂₀ 0,05%. A reação foi revelada pela adição de 50µl/poço de 1mg/ml de p-nitrofenil fosfato (pNPP), diluído em tampão de 1M de dietanolemina, 0,5 mM de MgCl₂, pH 9,8. A densidade ótica foi determinada em um leitor de ELISA (Labsystem Multiskan MS) a 405 nm. O *cut off* foi determinado baseado na média de 8 amostras de soros de ratos normais, somada com o desvio padrão multiplicado por três.

3.12- Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados mediante testes estatísticos para comparação, baseado nos tipos de distribuição das variáveis. As distribuições foram consideradas paramétricas ou não paramétricas segundo sua distribuição utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism* versão 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Os valores obtidos pelos estudos de cada variável contínua foram organizados e descritos pela média e desvio padrão. Para a comparação entre as médias dos grupos amostrais foi utilizado o ANOVA de uma e duas vias e *Sidak* como pós-teste. Para ser considerada diferença entre médias e frequências ou a

presença de correlação entre variáveis, foi utilizado o valor de significância estatística menor a 5 % ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS

Para que pudéssemos avaliar se a administração oral do colágeno do tipo V pode ser utilizada como imunoterapia, para a inibição da resposta inflamatória celular e do remodelamento da matriz fibrilar sinovial, após a instalação da sinovite em ratos, foram avaliados: o diâmetro articular, assim como os aspectos morfológicos e tomográficos, escore histopatológico, expressão de células inflamatórias, citocina, colágeno dos tipos I, III e V no tecido, e pesquisa de anticorpos anticolágeno II e V no soro.

4.1- Análise da variação do diâmetro articular

Na **Figura 6** identificamos aumento no diâmetro articular nos grupos **AI** e **AI-Col V** após 7 (**AI**: $3,513 \pm 1,404$ vs $0,125 \pm 0,354$, $p=0,0004$; **AI-Col V**: $2,920 \pm 1,102$ vs $0,100 \pm 0,316$, $p<0,0001$) e 14 dias (**AI**: $3,400 \pm 1,926$ vs $0,125 \pm 0,354$; $p=0,0070$; **AI-Col V**: $2,670 \pm 1,494$ vs $0,100 \pm 0,316$; $p=0,0023$) da indução da artrite, quando comparamos com o período inicial da indução (basal). Adicionalmente, observamos diminuição do diâmetro articular, tanto no grupo **AI** ($3,513 \pm 1,404$; vs $1,038 \pm 0,885$; $p=0,0075$), como no grupo **AI-Col V** ($2,920 \pm 1,102$ vs $0,680 \pm 0,835$; $p=0,0040$) entre os tempos 7 e 30 dias da indução da artrite.

Diâmetro articular

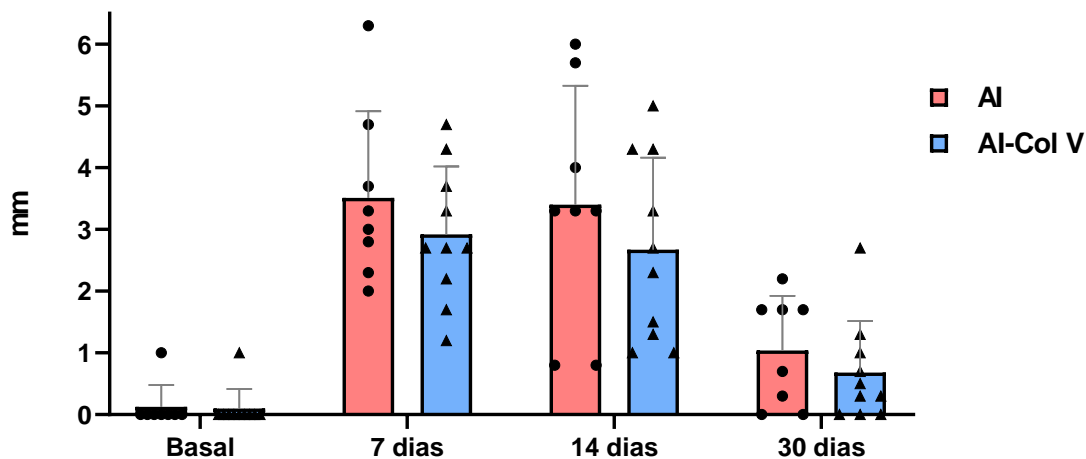


Figura 6 - Representação gráfica da variação do diâmetro articular (DA), em milímetros (mm), dos grupos **AI** e **AI-Col V**. Notar nos grupos **AI** e **AI-Col V**, aumento do DA em 7 e 14 dias, e diminuição em 30 dias. Basal: medida no tempo inicial do experimento. *GraphPad Prism versão 8; ANOVA two-way e Sidak como pós-teste.*

4.2- Monitoramento do efeito da imunoterapia oral com colágeno V por [18F]FDG por PET/CT

Na **Figura 7, Painéis A e B**, demonstramos a captação do [18F]FDG por PET/CT, que identificou o metabolismo da glicose celular durante a progressão da artrite. A captura do [18F]FDG, antes da indução de artrite (basal), em ambos os grupos (**AI** e **AI-Col V**), foi detectada com baixa captação, mostrando que os animais apresentaram incorporação dentro do padrão basal do fármaco. Entretanto, após 14 dias de indução da artrite nos animais do grupo **AI**, observamos aumento significativo da captação de [18F]FDG no joelho direito em relação ao joelho esquerdo dos animais deste grupo ($0,779 \pm 0,160$ vs $0,508 \pm 0,154$; $p=0,0067$). Também observamos no grupo **AI-Col V** aos 14 dias, previamente à administração oral de colágeno tipo V, aumento significativo da captação de [18F]FDG no joelho direito em relação ao joelho esquerdo ($0,848 \pm 0,247$ vs $0,617 \pm 0,165$; $p=0,0060$). No que se refere à captação do [18F]FDG no joelho direito após 30 dias, não houve diferença significativa entre

os grupos.

Além das análises entre os grupos, investigamos a variação temporal em cada grupo. Em relação ao grupo **AI** (joelho direito), houve diferença entre os tempos basal e 14 dias ($0,512 \pm 0,064$ vs $0,779 \pm 0,160$; $p=0,0045$). Porém, não houve diferença significativa entre os tempos basal e 30 dias, e entre os tempos 14 dias e 30 dias. Já com relação ao grupo **AI-Col V** (joelho direito), também encontramos diferença estatística entre os tempos basal e 14 dias ($0,523 \pm 0,130$ vs $0,848 \pm 0,247$; $p<0,0001$), e entre os tempos basal e 30 dias ($0,523 \pm 0,130$ vs $0,799 \pm 0,261$; $p<0,0001$). Também neste grupo, não houve diferença entre os tempos 14 e 30 dias.

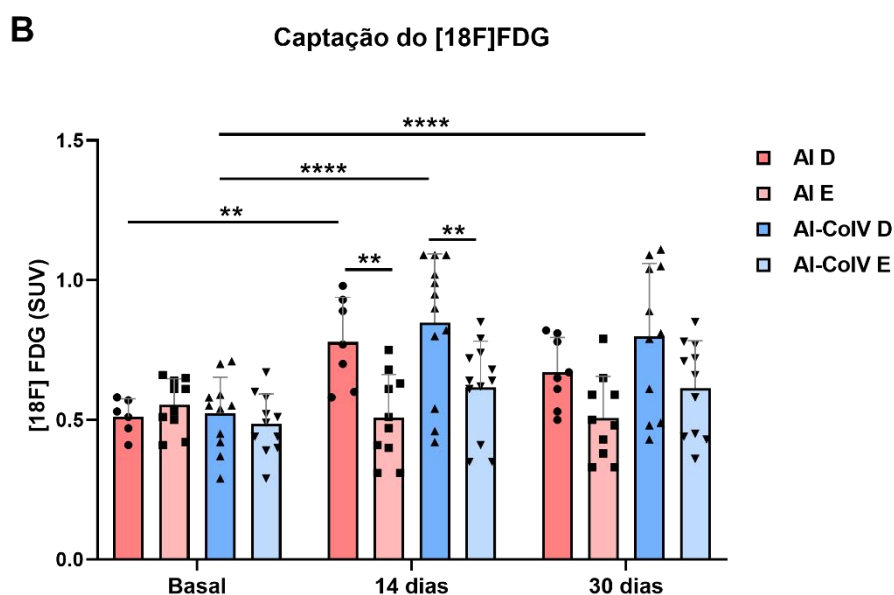
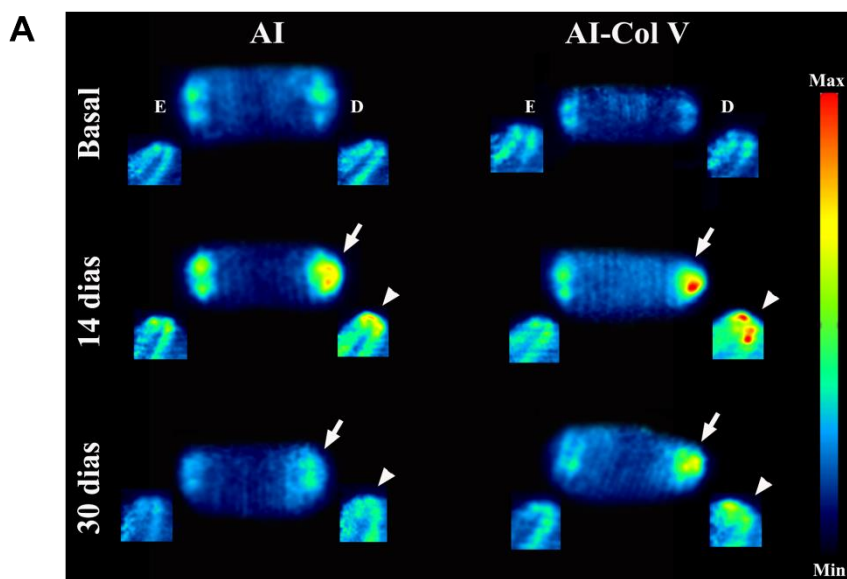
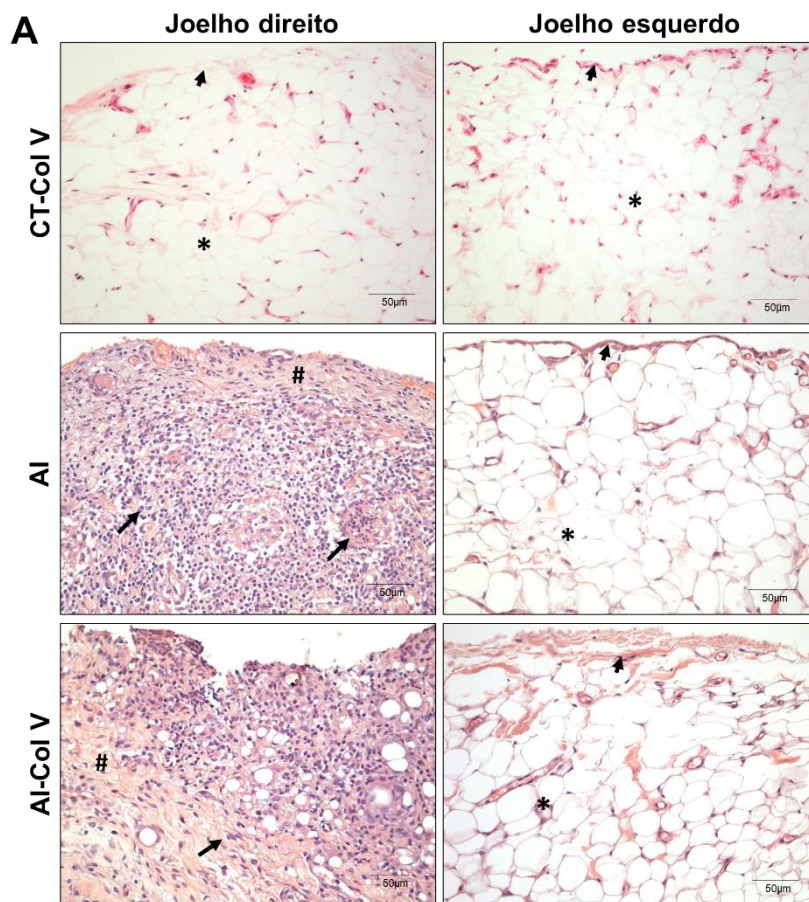


Figura 7 - PET/CT para captação do [18F]FDG nas articulações dos joelhos dos grupos **AI** e **AI-Col V**. No **Painel A**, observar as imagens da captação do [18F] FDG nos joelhos direito (**D**) e esquerdo (**E**) dos animais dos grupos **AI** e **AI-Col V** nos planos sagital (**seta**) e coronal (**cabeça de seta**) no período basal (inicial), 14 e 30 dias após a indução da artrite. Notar no 14º dia o aumento da intensidade de captação do [18F] FDG no joelho direito (**D**) em ambos os grupos e no joelho esquerdo (**E**) em relação ao basal. O **Painel B** mostra a representação gráfica da medida da captação do [18F] FDG, indicativo do metabolismo da glicose. *GraphPad Prism* versão 8; ANOVA *two-way* e *Sidak*, como pós-teste. (D: joelho direito; E: joelho esquerdo).

4.3- Análise morfológica do tecido sinovial e escore histopatológico

A **Figura 8, Painel A**, mostra o tecido sinovial dos animais dos grupos artrite (**AI**), artrite e tratados com colágeno V (**AI-Col V**) e controles (**CT-Col V**), corados com H&E. O tecido sinovial do joelho direito dos animais do grupo **CT-Col V**, apresentou a membrana sinovial uniforme, com uma fina camada de células, os sinoviócitos, que repousam sobre uma tela de tecido conjuntivo, composto de tecido adiposo-muscular e vasos. Quando comparamos com o tecido sinovial do joelho esquerdo do mesmo grupo, também nos deparamos com uma histoarquitetura uniforme com padrão similar ao joelho direito. Como este grupo não apresentou nenhum tipo de alteração, não realizamos as demais análises, e por esta razão utilizamos apenas os joelhos esquerdos contralaterais como controle. Por outro lado, no joelho direito dos animais do grupo **AI**, identificamos um intenso infiltrado de células inflamatórias distribuídas por todo tecido conjuntivo subsinovial, sendo mais proeminente ao redor da parede dos vasos. Neste grupo de animais também observamos depósito de colágeno, entre as células inflamatórias, assim como na parede de vasos sanguíneos, o que não observamos no joelho contralateral esquerdo, sem a indução da artrite. Ainda, na **Figura 8, Painel A** no grupo **AI-Col V**, observamos diminuição do infiltrado inflamatório em algumas regiões e remodelamento do tecido conjuntivo sinovial, caracterizado por depósito de colágeno, quando comparamos com o joelho contralateral esquerdo do mesmo grupo. No **Painel B**, encontra-se a representação gráfica do escore de *Krenn*, que avalia o grau de sinovite nas sinóvias dos grupos **AI** e **AI-Col V**. Notar aumento significativo na pontuação entre os joelhos direito e esquerdo do grupo **AI** ($6,083 \pm 1,929$ vs $0,444 \pm 0,727$; $p < 0,0001$), e uma diferença significativa entre os joelhos direito e esquerdo do grupo **AI-Col V** ($5,400 \pm 2,947$ vs $0,667 \pm 0,866$; $p < 0,0001$). No entanto, não

encontramos uma diferença significativa entre os grupos **AI** e **AI-Col V**.



B

Escore de *Krenn*

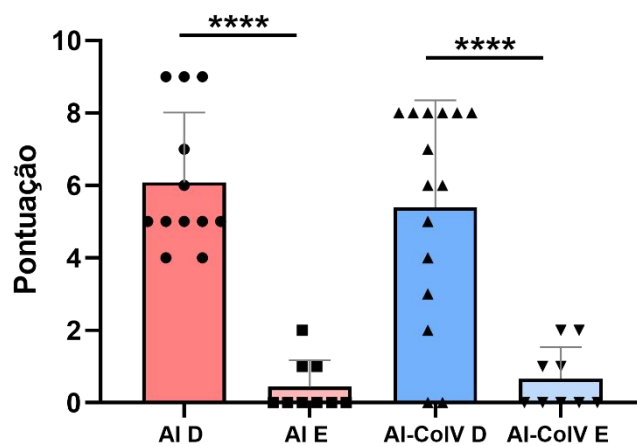


Figura 8 - Cortes transversais do tecido sinovial das articulações dos joelhos dos grupos **AI** e **AI-Col V** e grau de sinovite pelo escore de *Krenn*. O **Painel A** mostra o tecido sinovial dos animais dos grupos artrite (**AI**), artrite e tratados com colágeno V (**AI-Col V**) e controle (**CT-Col V**) corados pela H&E. A sinóvia do grupo **CT-Col V** apresenta a monocamada de sinoviócitos e a histoarquitetura (**cabeça de seta**) de aspecto normal, com tecido conjuntivo, células adiposas (*) e vasos obedecendo a um padrão normal, similar à morfologia do tecido sinovial do joelho

esquerdo. Notar no grupo **AI** intenso infiltrado de células inflamatórias, espessamento da parede vascular (**setas**) e depósito de colágeno (**#**), quando comparamos ao joelho esquerdo. No grupo **AI-Col V** notar diminuição do infiltrado inflamatório em algumas regiões (**seta**) e aumento do depósito de fibras colágenas (**#**) no tecido subsinovial, quando relacionamos com a histoarquitetura do joelho esquerdo. O **Painel B** mostra a representação gráfica do escore histopatológico de *Krenn*, para avaliação do grau de sinovite nos grupos **AI** e **AI-Col V**. *GraphPad Prism* versão 8; ANOVA *one-way* e *Sidak* como pós-teste. (D: joelho direito; E: joelho esquerdo).

4.4- Análise do infiltrado inflamatório e apoptose celular

A quantificação de CD3+ no tecido sinovial do joelho direito do grupo **AI** (**Figura 9, Painéis A e B**), mostrou um aumento significativo de linfócitos T totais, após 30 dias de indução da artrite, quando comparamos com o joelho esquerdo deste grupo ($57,540 \pm 15,960$ vs $2,704 \pm 3,726$; $p < 0,0001$). Ainda, a imunomarcção para CD3+ no tecido sinovial do joelho direito do grupo **AI-Col V** também mostrou aumento significativo de linfócitos T totais, quando comparado ao joelho esquerdo deste grupo ($53,600 \pm 13,030$ vs $3,655 \pm 2,340$; $p < 0,0001$). No entanto, não encontramos diferença estatística entre os grupos **AI** e **AI-Col V** (**Figura 9, Painéis A e B**).

Os resultados da quantificação de linfócitos T CD4+ no tecido sinovial no joelho direito do grupo **AI** (**Figura 10, Painéis A e B**), mostram um aumento significativo da expressão deste marcador celular no tecido aos 30 dias de indução da artrite, quando comparamos com o joelho esquerdo ($37,570 \pm 16,810$ vs $4,848 \pm 3,826$; $p < 0,0001$). No grupo **AI-Col V**, também encontramos aumento significativo de linfócitos T CD4+ no tecido sinovial do joelho direito em relação ao esquerdo ($32,12 \pm 7,722$ vs $3,328 \pm 3,002$; $p < 0,0001$). Por outro lado, não houve diferença estatística entre os grupos **AI** e **AI-Col V** (**Figura 10, Painéis A e B**).

Na **Figura 11, Painéis A e B**, encontramos a quantificação de linfócitos T CD8+ no tecido sinovial. É possível notar no joelho direito do grupo **AI** um aumento significativo da expressão deste marcador celular, quando comparamos com o joelho esquerdo ($42,370 \pm 6,700$ vs $6,573 \pm 5,582$; $p < 0,0001$). Bem como, um aumento significativo de linfócitos T CD8+ no tecido sinovial do joelho direito do grupo **AI-Col V** em relação ao esquerdo ($47,250 \pm 9,629$ vs $3,293 \pm 3,089$; $p < 0,0001$). No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos **AI** e **AI-Col V**.

Na **Figura 12, Painéis A e B**, estão os resultados da quantificação de

linfócitos B CD20+ no tecido sinovial. Observar que a expressão deste marcador no joelho direito do grupo **AI** teve um aumento significativo, quando comparado com o joelho esquerdo ($35,060 \pm 11,230$ vs $2,744 \pm 1,632$; $p < 0,0001$). Há também, um aumento significativo entre os joelhos direito e esquerdo do grupo **AI-Col V** ($39,260 \pm 9,730$ vs $5,580 \pm 2,775$; $p < 0,0001$). Porém, não houve diferença estatística entre os grupos **AI** e **AI-Col V**.

Na **Figura 13, Painéis A e B**, estão os resultados da quantificação de macrófagos CD68+ na sinóvia. Notar que a expressão deste marcador no joelho direito do grupo **AI** teve um aumento significativo, quando comparado com o joelho esquerdo ($11,800 \pm 6,041$ vs $1,100 \pm 2,200$; $p = 0,0032$). Há também, um aumento significativo na expressão de CD68+ na sinóvia do joelho direito dos animais do grupo **AI-Col V**, em relação ao esquerdo ($7,965 \pm 4,651$ vs $0,703 \pm 1,092$; $p = 0,0161$). Porém, não houve diferença estatística entre os grupos **AI** e **AI-Col V**.

Por outro lado, na **Figura 14, Painéis A e B**, identificamos um aumento significativo da expressão do Fator de Transcrição FoxP3+ no tecido subsinovial e perivascular do joelho direito do grupo do **AI-Col V**, quando comparamos com o joelho esquerdo ($23,320 \pm 6,490$ vs $3,070 \pm 2,399$; $p < 0,0001$). Ainda, observamos um aumento importante de células positivas para FoxP3+ no tecido subsinovial e ao redor de vasos sanguíneos subsinoviais do joelho direito do grupo **AI-Col V**, quando comparamos com o grupo **AI** ($23,320 \pm 6,490$ vs $11,850 \pm 5,415$; $p = 0,0001$).

Na **Figura 15 Painéis, A e B**, estão os resultados da expressão de caspase 3+ no tecido sinovial. Podemos notar um aumento importante e significativo deste marcador de apoptose celular no tecido sinovial do joelho direito dos animais do grupo **AI-Col V**, em relação ao grupo **AI** ($28,410 \pm 11,710$ vs $12,040 \pm 7,901$; $p = 0,0024$). Também encontramos aumento significativo de caspase 3+ no tecido sinovial do joelho direito do grupo **AI-Col V**, em relação ao esquerdo ($28,410 \pm 11,710$ vs $0,323 \pm 0,792$; $p < 0,0001$).

Os resultados da quantificação da IL-10 presentes na **Figura 16, Painéis A e B**, mostram um aumento significativo de células imunomarcadas para IL-10, no tecido sinovial do joelho direito do grupo **AI-Col V**, em relação ao joelho direito do grupo **AI** ($57,930 \pm 7,696$ vs $41,240 \pm 17,200$; $p = 0,0027$). Além disso, também

observamos aumento da expressão de IL-10 na sinóvia do joelho direito do grupo **AI**, em relação ao contralateral esquerdo ($41,240 \pm 17,200$ vs $4,268 \pm 3,250$; $p < 0,0001$), e quando comparamos os joelhos direito e esquerdo do grupo **AI-Col V** ($57,930 \pm 7,696$ vs $2,115 \pm 2,701$; $p < 0,0001$).

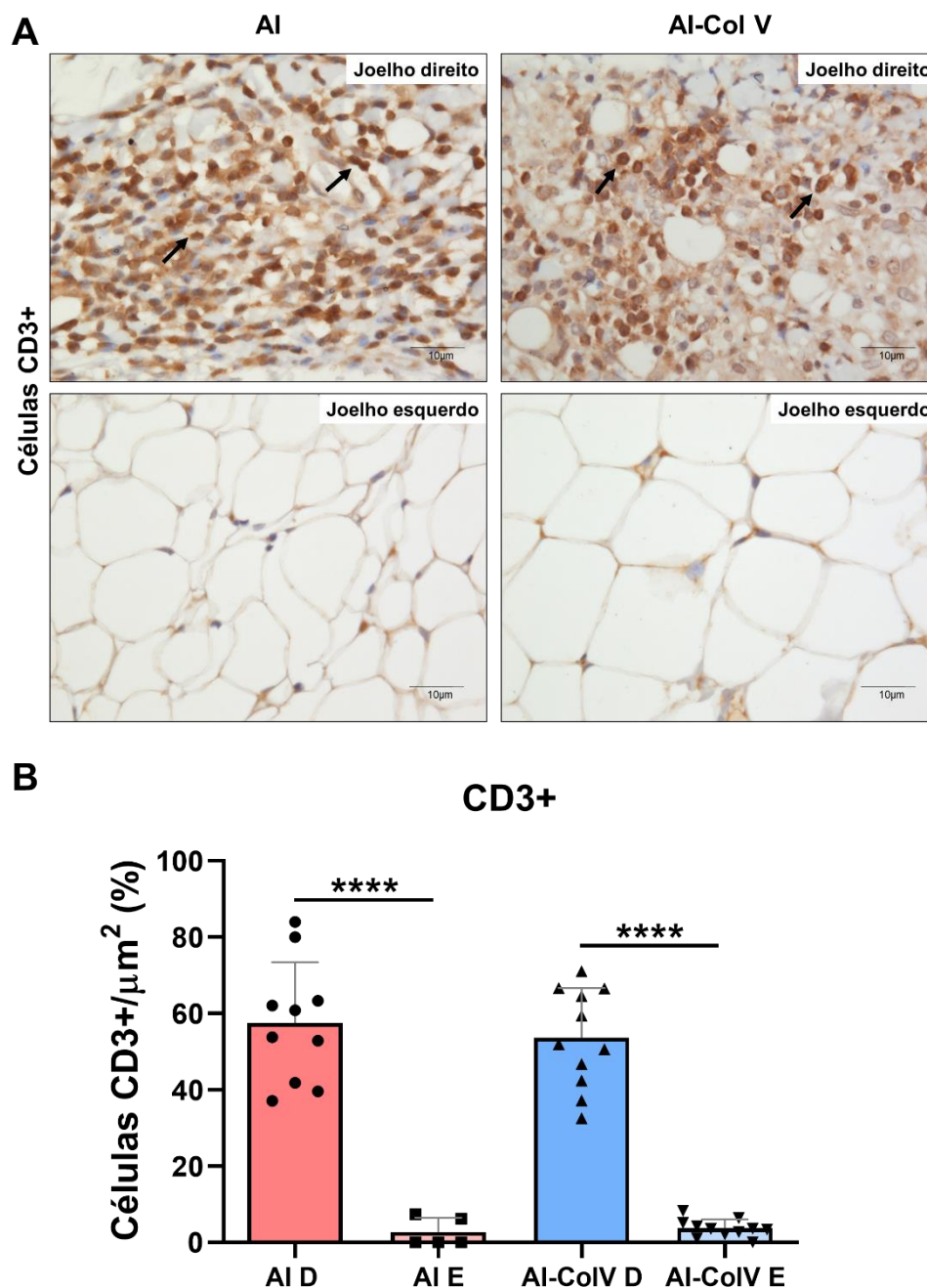


Figura 9 - Imunomarcção para linfócitos T totais (CD3+) no tecido sinovial das articulações dos joelhos dos grupos **AI** e **AI-Col V**. No **Painel A** observamos o tecido sinovial dos grupos **AI** e **AI-Col V** imunomarcados para linfócitos T CD3. Notar nos joelhos direitos dos grupos **AI** e **AI-Col V**, aumento significativo de células CD3+ no tecido sinovial aos 30 dias de indução da artrite (**setas**), quando comparado ao joelho contralateral. O **Painel B** mostra a representação gráfica da quantificação da expressão de CD3 no tecido sinovial, identificando a diferença estatística

entre os joelhos direito e esquerdo dos grupos **AI** ($****p<0,0001$) e **AI-Col V** ($****p<0,0001$). *GraphPad Prism* versão 8; *Anova one way* e *Sidak* como pós-teste. (D: joelho direito; E: joelho esquerdo).

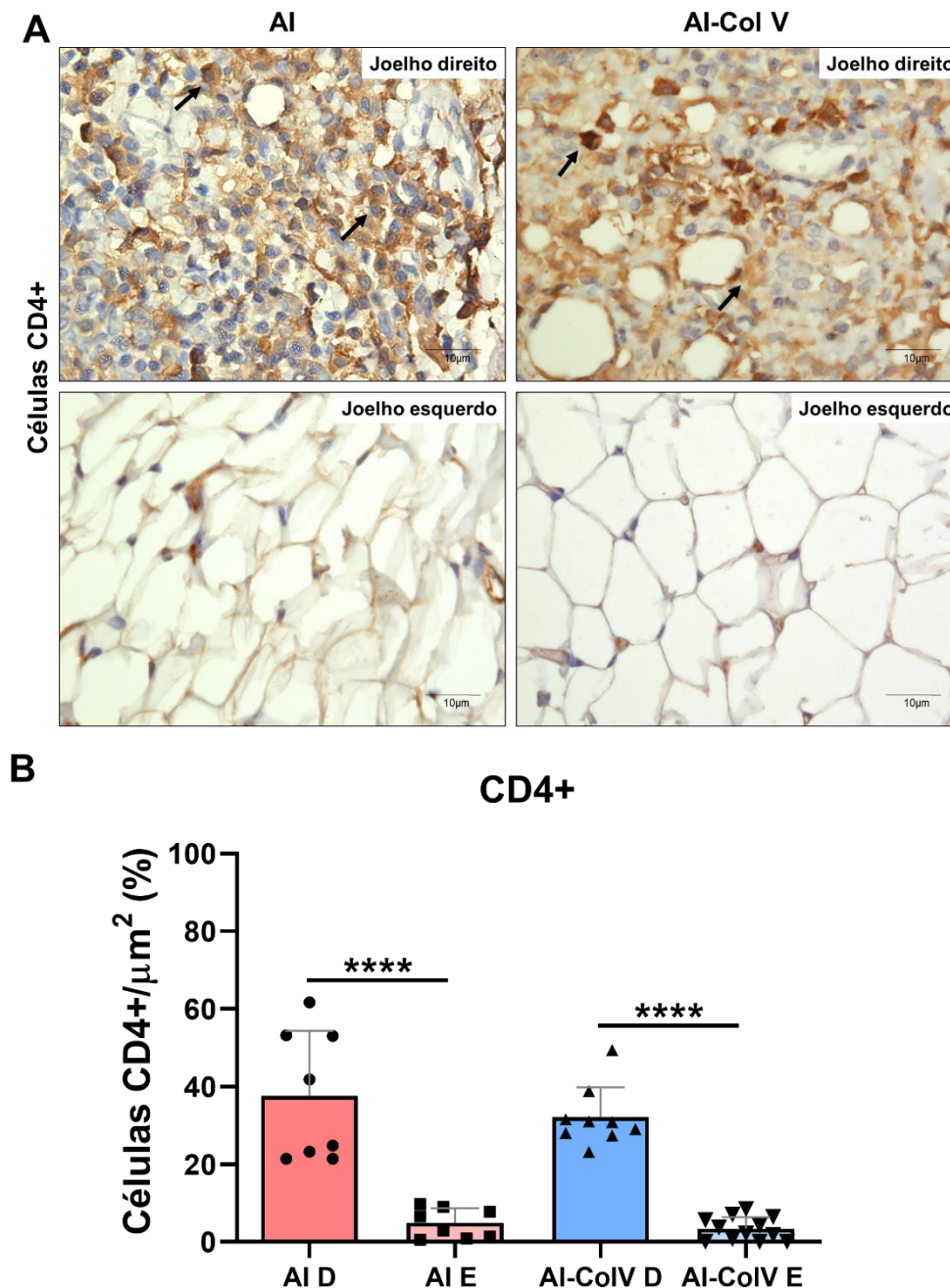


Figura 10 - Imunomarcagem para linfócitos T CD4+ no tecido sinovial das articulações dos joelhos dos grupos **AI** e **AI-Col V**. No **Painel A** observamos o tecido sinovial dos grupos **AI** e **AI-Col V** imunomarcados para linfócitos T CD4+. Notar no joelho direito dos grupos **AI** e **AI-Col V** aumento significativo de células CD4+ no tecido aos 30 dias de indução da artrite (**setas**), quando comparados ao joelho esquerdo dos respectivos grupos. O **Painel B** mostra a representação gráfica da quantificação da expressão de CD4+ no tecido, identificando a diferença estatística entre os joelhos direito e esquerdo dos grupos **AI** ($****p<0,0001$) e **AI-Col V** ($****p<0,0001$).

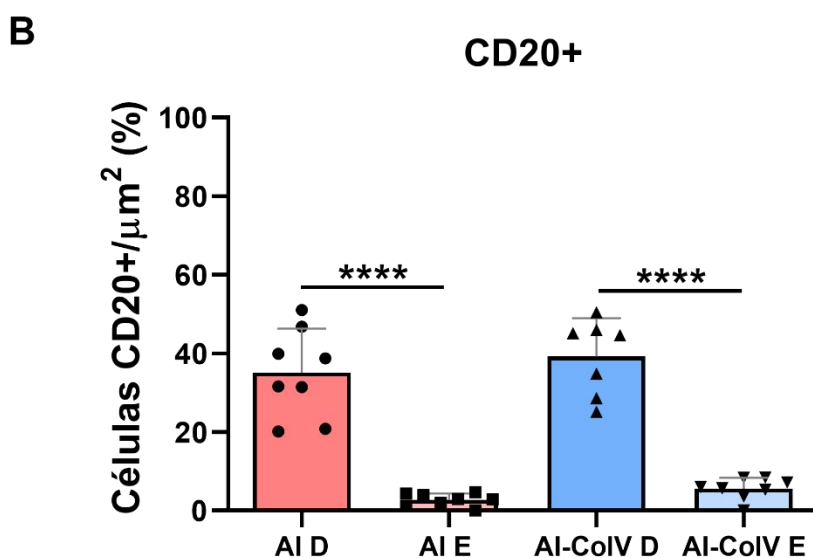
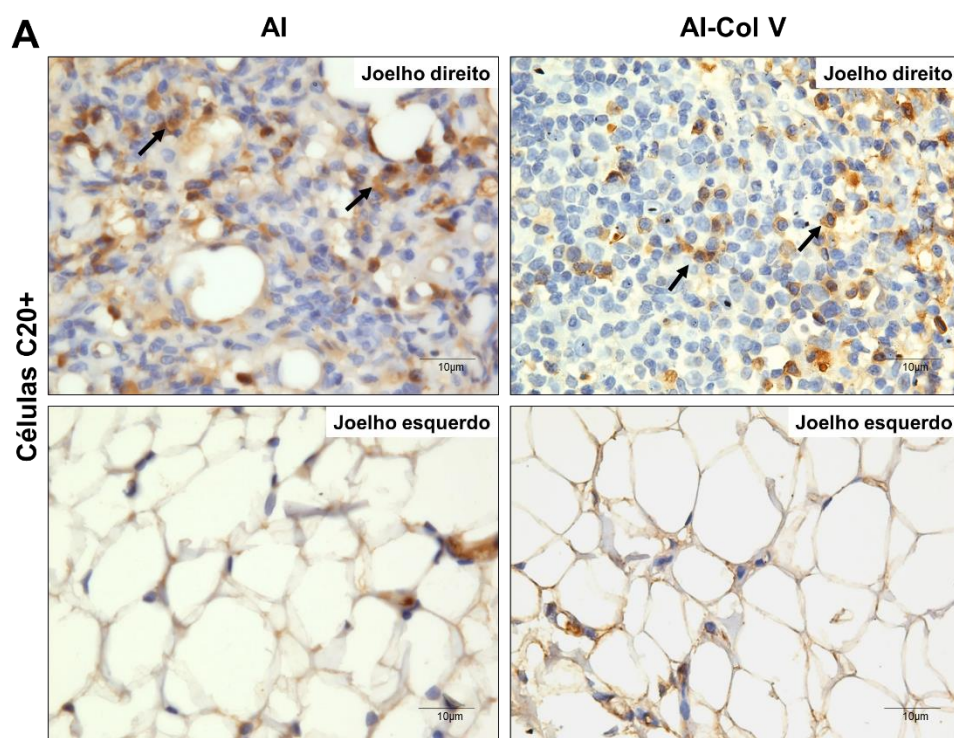


Figura 12 - Imunomarcção para linfócitos B CD20+ no tecido sinovial das articulações dos joelhos dos grupos **AI** e **AI-Col V**. No **Painel A** observamos o tecido sinovial dos grupos **AI** e **AI-Col V** imunomarcados para linfócitos T CD20. É possível observar no tecido sinovial dos joelhos direitos dos grupos **AI** e **AI-Col V** aumento na expressão de células CD20+ após a indução da artrite (**setas**), quando comparado aos contralaterais esquerdos. O **Painel B** mostra a representação gráfica da quantificação da expressão de CD20+ no tecido sinovial, identificando a diferença estatística encontrada entre os joelhos direito e esquerdo dos grupos **AI** (** $p < 0,0001$) e **AI-Col V** (** $p < 0,0001$). *GraphPad Prism* versão 8; *Anova one way* e *Sidak* como pós-teste. (D: joelho direito; E: joelho esquerdo).

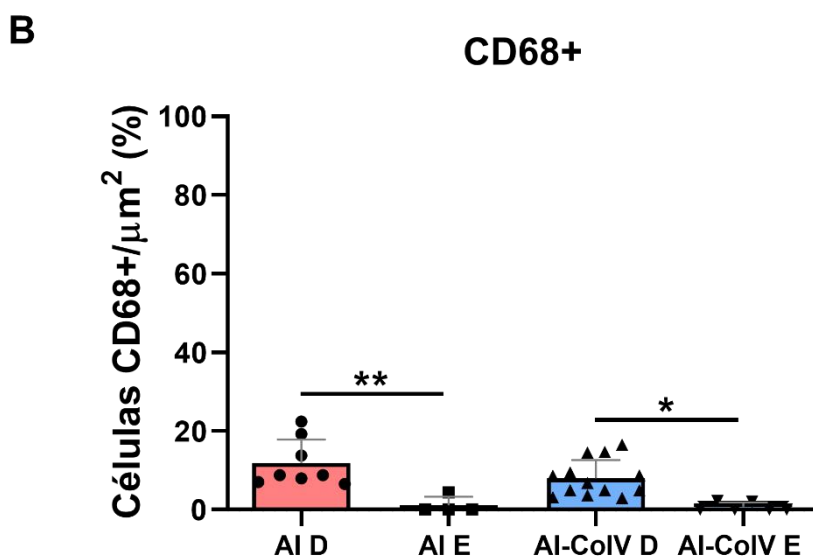
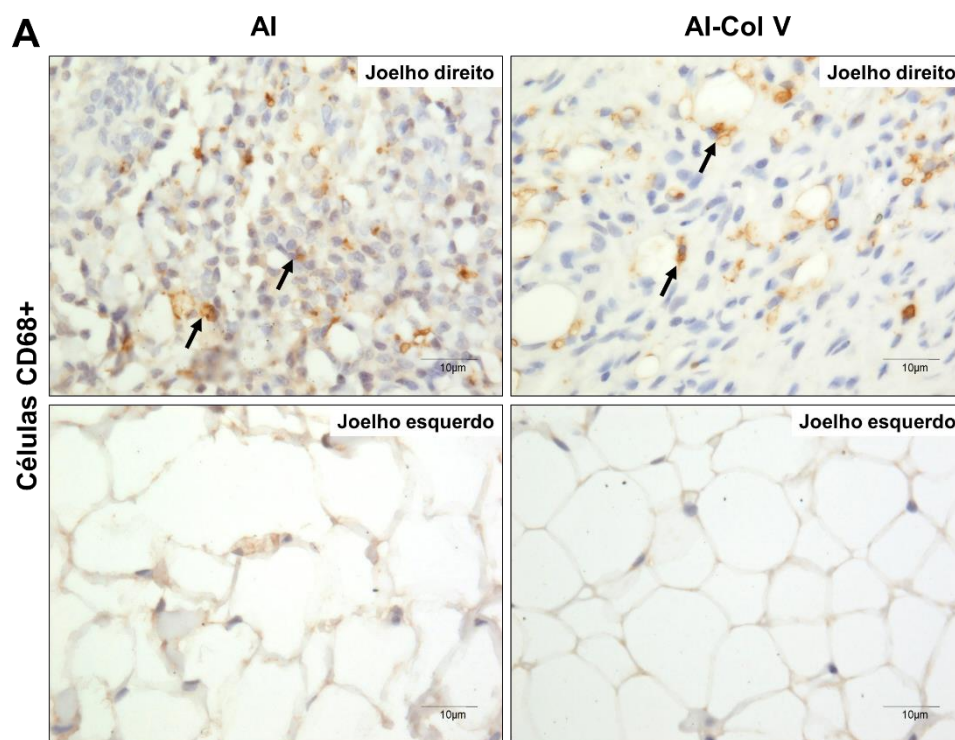


Figura 13 - Imunomarcagem para macrófagos CD68+ no tecido sinovial das articulações dos joelhos dos grupos AI e AI-Col V. No **Painel A** observamos o tecido sinovial dos grupos AI e AI-Col V imunomarcados para macrófagos CD68+. É possível observar no tecido sinovial dos joelhos direitos dos grupos AI e AI-Col V aumento na expressão dessas células após a indução da artrite (**setas**), quando comparados aos contralaterais esquerdos. O **Painel B** mostra a representação gráfica da quantificação da expressão de CD68+, identificando a diferença estatística encontrada entre os joelhos direitos e esquerdos dos grupos AI (** $p=0,0032$) e AI-Col V (* $p=0,0161$). GraphPad Prism versão 8; Anova one way e Sidak como pós-teste. (D: joelho direito; E: joelho esquerdo).

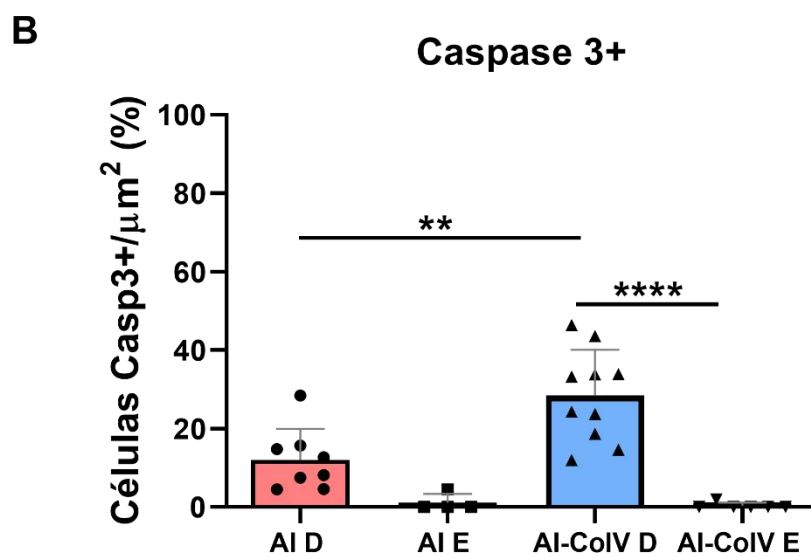
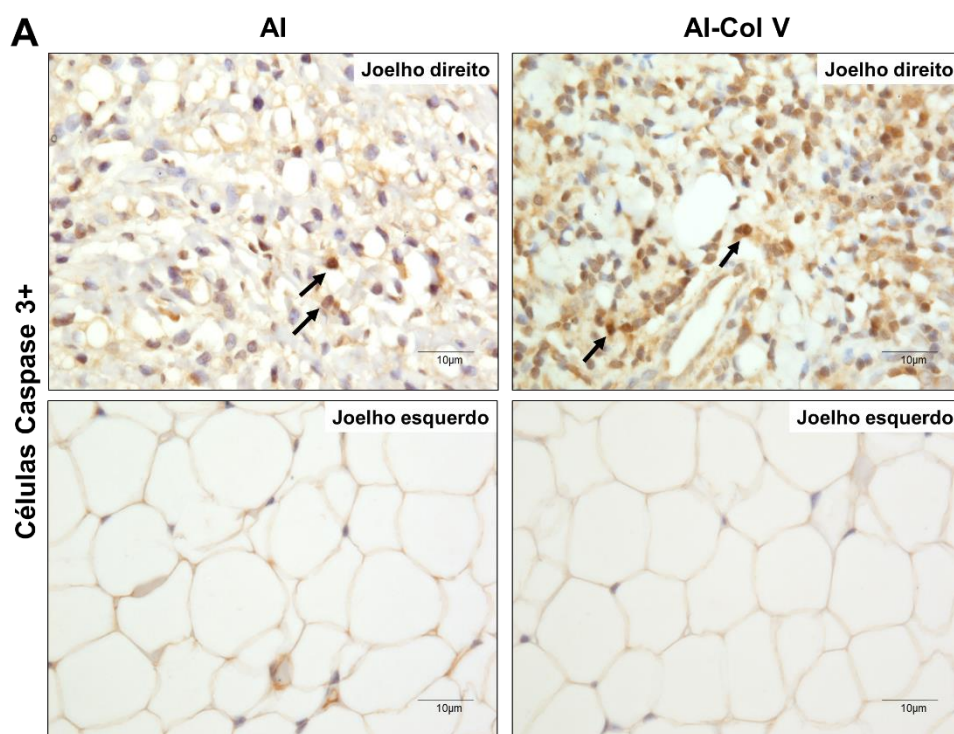


Figura 15 - Imunomarcção para caspase 3 no tecido sinovial das articulações dos joelhos dos grupos **AI** e **AI-CoI V**. No **Painel A** observamos um aumento na expressão de caspase 3 no tecido sinovial no joelho direito do grupo **AI-CoI V** (**setas**), quando comparado ao grupo **AI** (**setas**). O **Painel B** mostra a representação gráfica da quantificação da expressão de caspase 3 na sinóvia, identificando a diferença estatística entre os joelhos direitos dos grupos **AI-CoI V** e **AI** (** $p=0,0024$). *GraphPad Prism* versão 8; *Anova one way* e *Sidak* como pós-teste. (D: joelho direito; E: joelho esquerdo).

4.5- Alterações da matriz fibrilar no tecido sinovial

Na **Figura 17 (Painel A)** identificamos um aumento significativo da birrefringência em verde, caracterizada por uma distribuição irregular na tela sinovial e na parede dos vasos, resultante da imunomarcação para colágeno do tipo I no joelho direito do grupo **AI-Col V**, quando comparamos com o grupo **AI** ($16,180 \pm 3,786$ vs $11,150 \pm 3,220$; $p=0,0328$) (**Figura 17, Painéis A e B**). Também encontramos aumento significativo de colágeno tipo I no tecido sinovial do joelho direito, em relação ao contralateral esquerdo do grupo **AI-Col V** ($16,180 \pm 3,786$ vs $11,620 \pm 4,174$; $p=0,0452$) (**Figura 17, Painel B**). Contudo, no joelho esquerdo dos grupos estudados, encontramos padrão normal de expressão do colágeno do tipo I no tecido conjuntivo adjacente aos adipócitos e vasos sanguíneos.

Por outro lado, não encontramos diferença significativa referente a imunomarcação para colágeno do tipo III no tecido sinovial entre os grupos estudados (**Figura 18, Painéis A e B**). A imunomarcação para colágeno tipo III mostrou um padrão homogêneo e regular, envolvendo os adipócitos e a parede de vasos e capilares no tecido conjuntivo sinovial dos dois grupos (**Figura 18, Painel A**).

Ainda, na **Figura 19 (Painel A e B)** observamos um aumento significativo da expressão de colágeno do tipo V no tecido subsinovial do joelho direito do grupo **AI**, quando comparado ao joelho direito do grupo **AI-Col V** ($12,160 \pm 5,851$ vs $2,762 \pm 1,203$; $p < 0,0001$), caracterizado por um padrão difuso e singular, formando uma tela de fibras finas envolvendo as células do infiltrado inflamatório. Ainda, identificamos um aumento da birrefringência verde no tecido subsinovial do joelho direito do grupo **AI**, quando comparado ao joelho esquerdo contralateral ($12,160 \pm 5,851$ vs $4,628 \pm 1,511$; $p < 0,0001$). A expressão do colágeno V (birrefringência em verde) no joelho esquerdo dos grupos **AI** e **AI-Col V**, apresentou-se distribuída na parede dos vasos e capilares, assim como na tela sinovial.

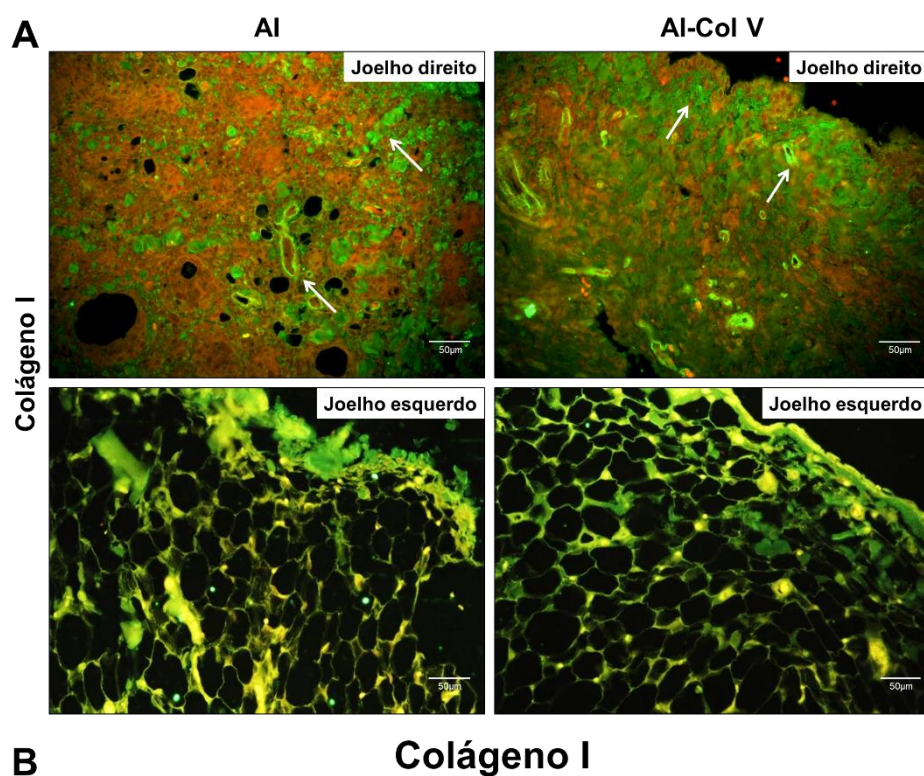


Figura 17 - Imunofluorescência para colágeno do tipo I no tecido subsinovial dos grupos **AI** e **AI-Col V**. No **Painel A** observamos intenso aumento da birrefringência verde para o colágeno do tipo I, com distribuição irregular na tela sinovial (**setas**) e na parede dos vasos no joelho direito do grupo **AI-Col V**. O tecido sinovial do joelho direito do grupo **AI** mostra birrefringência verde para colágeno tipo I heterogênea, com predomínio em vasos e capilares (**setas**). Notar no **Painel B**, a representação gráfica da quantificação da expressão de colágeno do tipo I no tecido sinovial e a diferença significativa entre os joelhos dos grupos **AI** e **AI-Col V** ($*p=0,0328$, $*p=0,0452$). *GraphPad Prism* versão 8; *Anova one way* e *Sidak* como pós-teste. (D: joelho direito; E: joelho esquerdo).

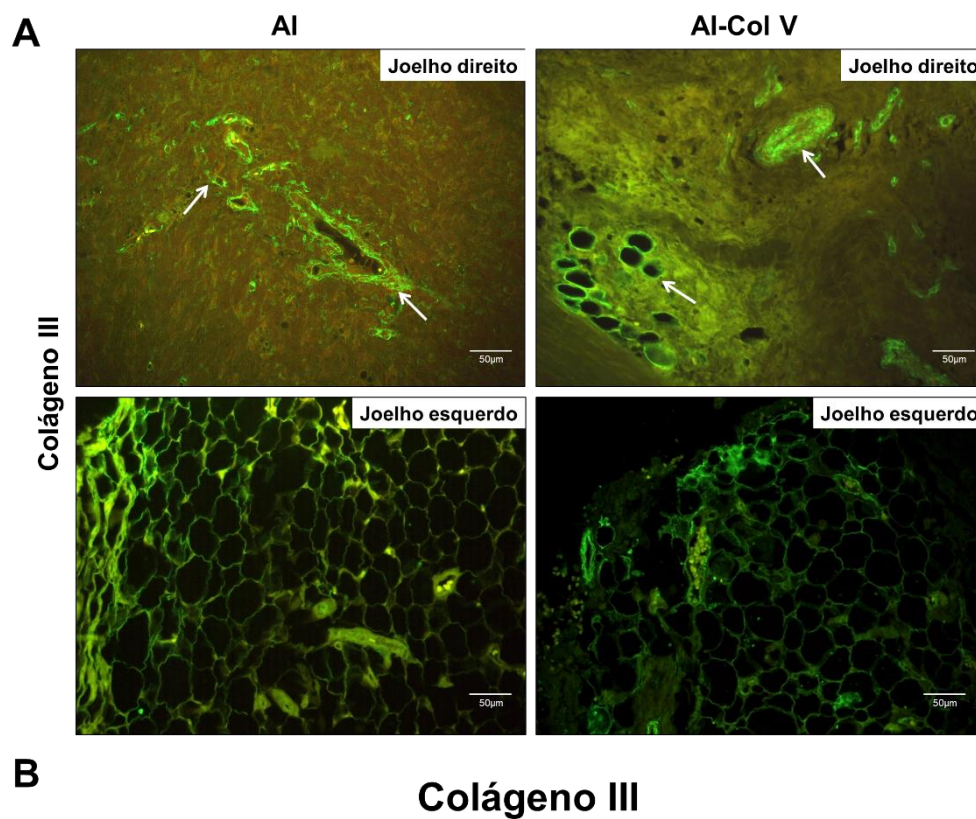


Figura 18 - Imunofluorescência para colágeno do tipo III no tecido subsinovial dos grupos **AI** e **AI-Col V**. No **Painel A**, não identificamos diferença significativa da expressão do colágeno do tipo III (**setas**) no tecido sinovial entre os grupos. No **Painel B**, observamos a representação gráfica do conteúdo de colágeno do tipo III entre os grupos **AI** e **AI-Col V**. *GraphPad Prism* versão 8; *Anova one way* e *Sidak* como pós-teste. (D: joelho direito; E: joelho esquerdo).

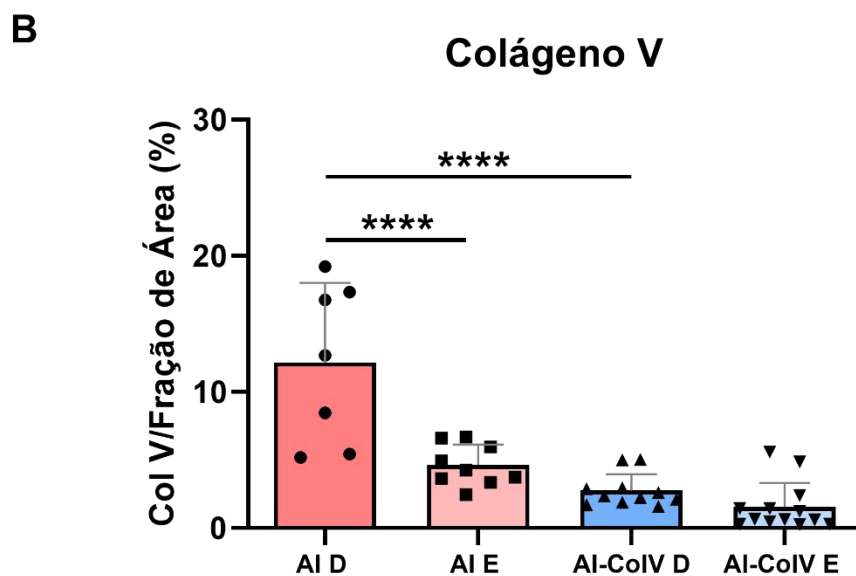
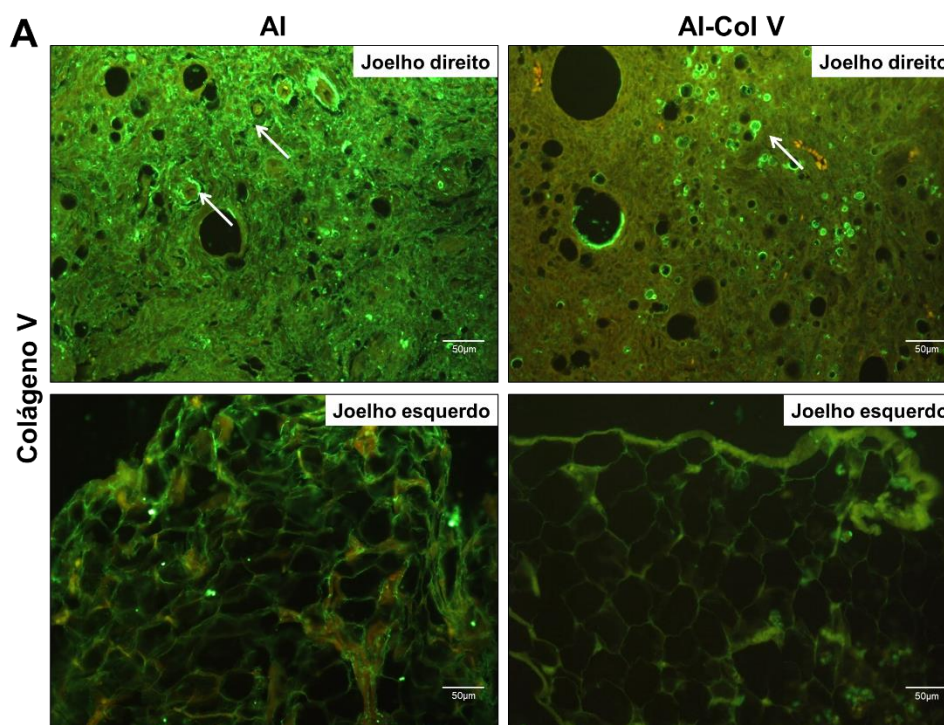


Figura 19 - Imunofluorescência para colágeno do tipo V no tecido subsinovial dos grupos **AI** e **AI-Col V**. Os **Painéis A** e **B**, mostram um intenso aumento da expressão de colágeno do tipo V (**setas**) no joelho direito do grupo **AI-Col V**, em relação ao grupo **AI**. Notar no **Painel B**, a representação gráfica da quantificação da expressão de colágeno do tipo V no tecido sinovial e a diferença estatística entre os joelhos direitos dos grupos **AI-Col V** e **AI** (**** $p < 0,0001$). *GraphPad Prism* versão 8; *Anova one way* e *Sidak* como pós-teste.

4.6- Análise da colocalização do colágeno V e marcadores celulares no tecido sinovial

Para analisar o perfil de células induzidas após a imunoterapia oral com colágeno V e estudar os possíveis mecanismos envolvidos nesta imunoterapia, realizamos duplas marcações por imunofluorescência.

Na **Figura 20 (Painéis A-H)** encontra-se a imunomarcação para colágeno V (birrefringência em verde) e para a IL-10+ (birrefringência em vermelho) e o núcleo corado em azul. Nos **Painéis A-D** podemos observar no grupo **AI** intensa fluorescência para o colágeno V e marcação para IL-10+, porém há baixa colocalização (merge) destes marcadores. No grupo **AI-Col V** também há tênue colocalização, uma vez que há fraca fluorescência para colágeno V e intensa marcação de IL-10+ (**Figura 25, Painéis E-H**).

Na **Figura 21 (Painéis A-H)**, imunomarcação para FoxP3+ (birrefringência em verde), IL-10+ (birrefringência em vermelho) e núcleo em azul. No grupo **AI (Painéis A-D)**, notar colocalização (merge) apenas em algumas regiões do tecido sinovial quando comparado ao grupo **AI-Col V**, que expressa intensa colocalização.

Na **Figura 22 (Painéis A-H)** podemos observar no tecido sinovial a imunomarcação para linfócitos T CD3+ (birrefringência em verde) e caspase 3 (birrefringência em vermelho) e núcleo corado em azul. Nos **Painéis A-D** podemos observar a colocalização destes marcadores em algumas regiões do tecido subsinovial. Já no grupo **AI-Col V** (joelho direito), nos **Painéis E-H** notamos um importante aumento na colocalização (merge) de CD3+ e caspase 3+, quando comparado ao grupo **AI**.

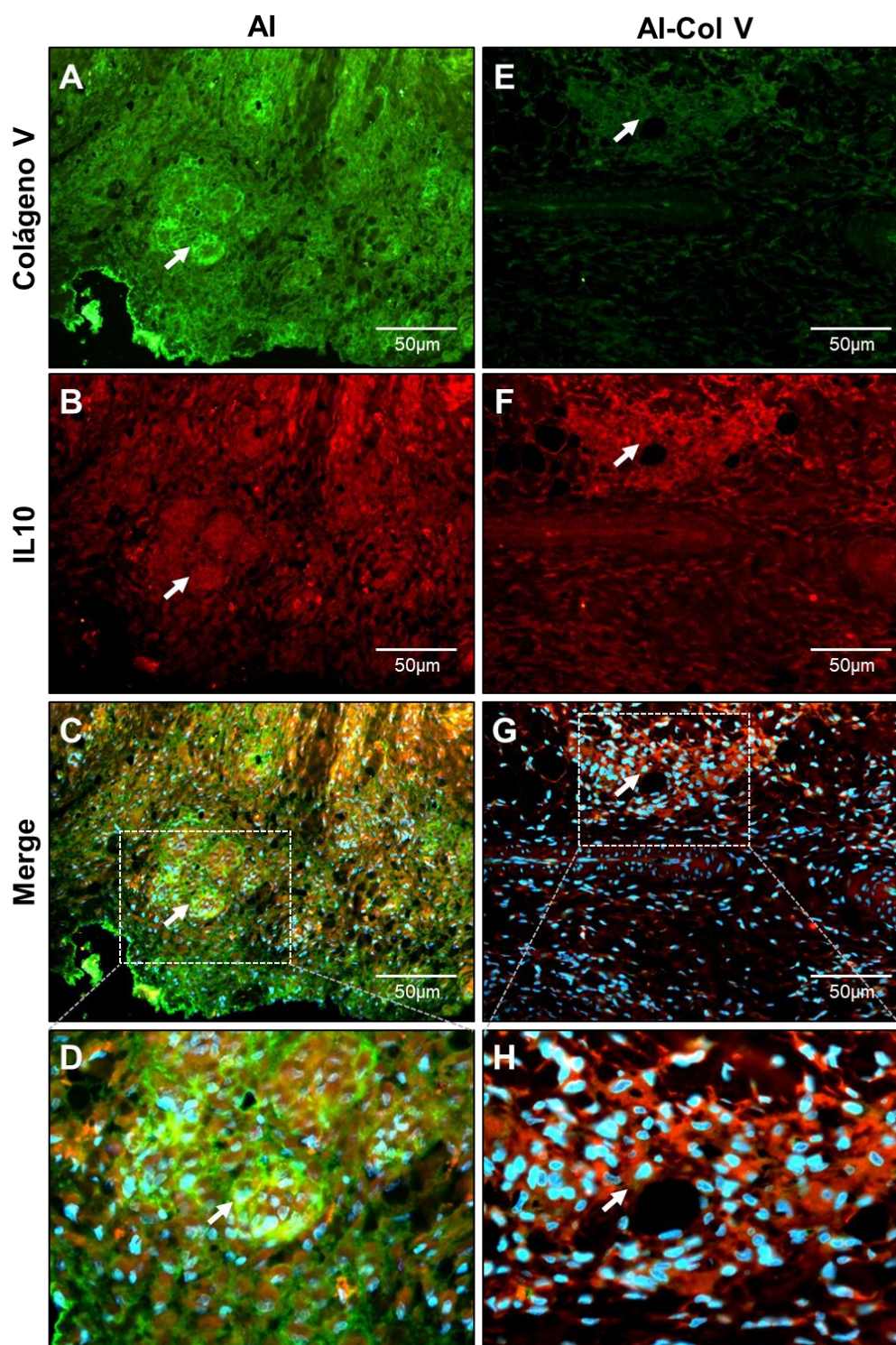


Figura 20 - Imunofluorescência para colágeno V (birrefringência em verde) e IL-10 (birrefringência em vermelho) e colocalização (merge) destes marcadores no tecido sinovial dos grupos **AI** (joelho direito) e **AI-Col V** (joelho direito). O núcleo está corado em azul pelo DAPI. Notar no grupo **AI** maior intensidade de colágeno V e menos IL-10 (**setas**), já no grupo **AI-Col V**, há mais IL-10 e menos colágeno V (**setas**).

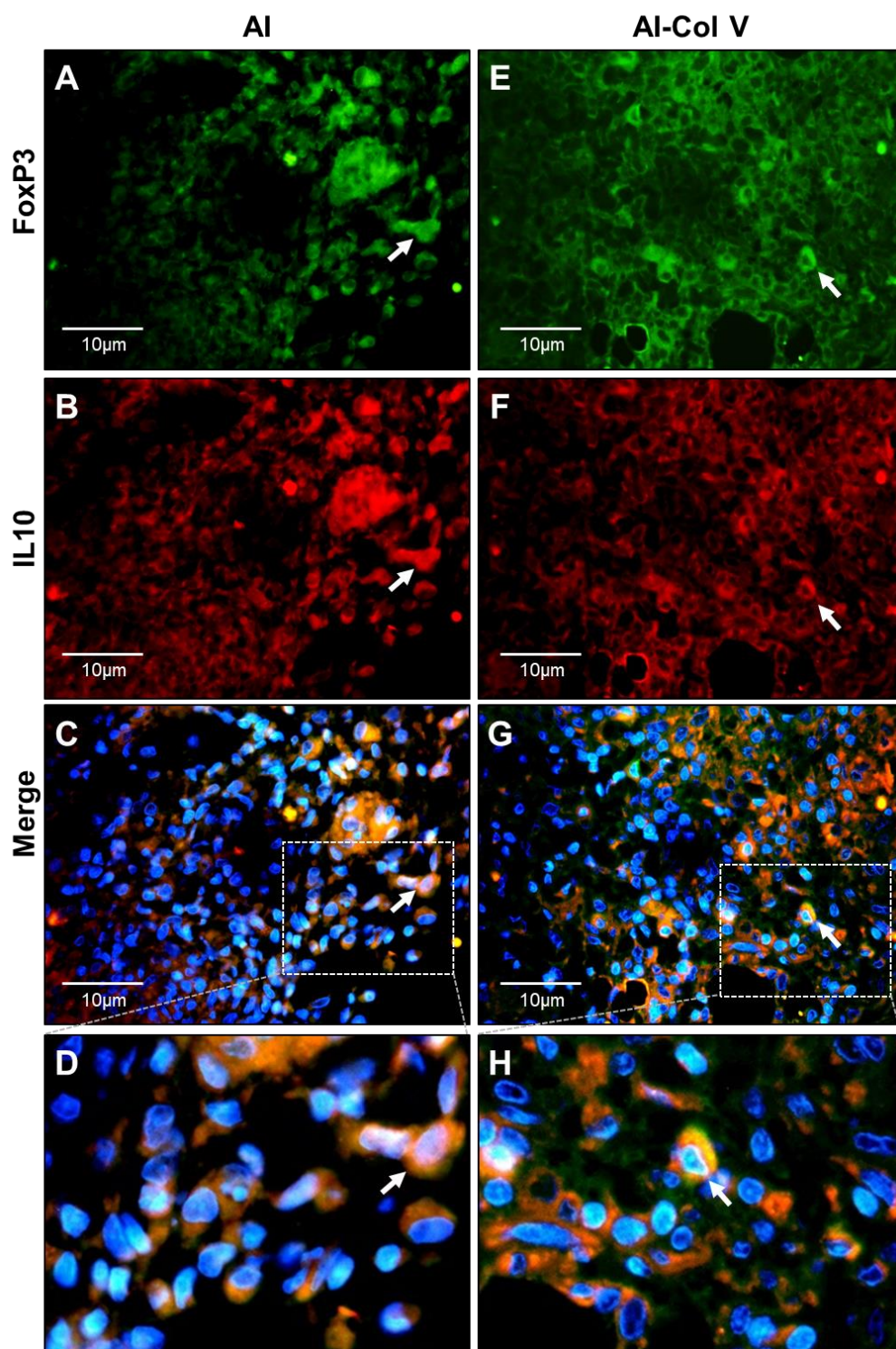


Figura 21 - Imunofluorescência para FoxP3 (birrefringência em verde) e IL-10 (birrefringência em vermelho) e colocalização (merge) destes marcadores no tecido sinovial dos grupos **AI** (joelho direito) e **AI-Col V** (joelho direito). O núcleo está corado em azul pelo DAPI. Notar colocalização de ambos marcadores (**setas**), com maior intensidade no grupo **AI-Col V** (merge) em relação ao **AI**.

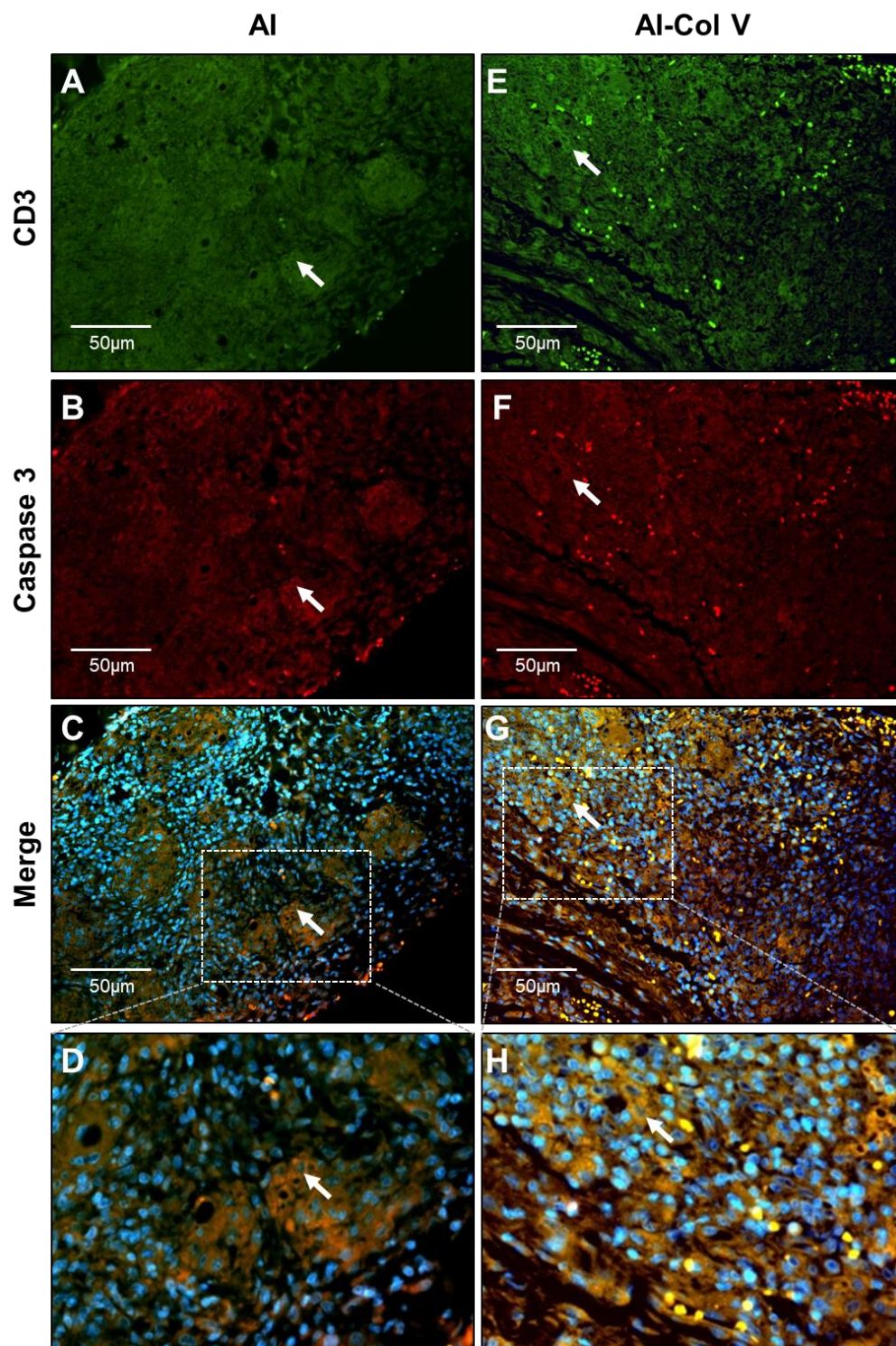


Figura 22 - Imunofluorescência para CD3 (birrefringência em verde) e caspase 3 (birrefringência em vermelho) e colocalização (merge) destes marcadores no tecido sinovial dos grupos **AI** (joelho direito) e **AI-Col V** (joelho direito). O núcleo está corado em azul pelo DAPI. Notar colocalização de ambos marcadores (**setas**), com maior intensidade no grupo **AI-Col V** (merge) em relação ao **AI**.

4.7- Análise da pesquisa de anticorpos anticolágeno do tipo V no soro

O ELISA foi realizado com os soros dos animais dos grupos **AI** e **AI-Col V** para se verificar a frequência de autoanticorpos anticolágeno dos tipos II e V circulantes. Os soros controle foram provenientes dos ratos, antes que recebessem a injeção intra-articular de mBSA. Anticorpos anticolágeno II estavam presentes no soro de 50% dos animais do grupo **AI** e em 46,6% dos animais do grupo **AI-Col V** (**Figura 23, Painel A**). Ainda, anticorpos anticolágeno V estavam presentes no soro de 50% dos animais do grupo **AI** e em 58,3% dos animais do grupo **AI-Col V** (**Figura 23, Painel B**).

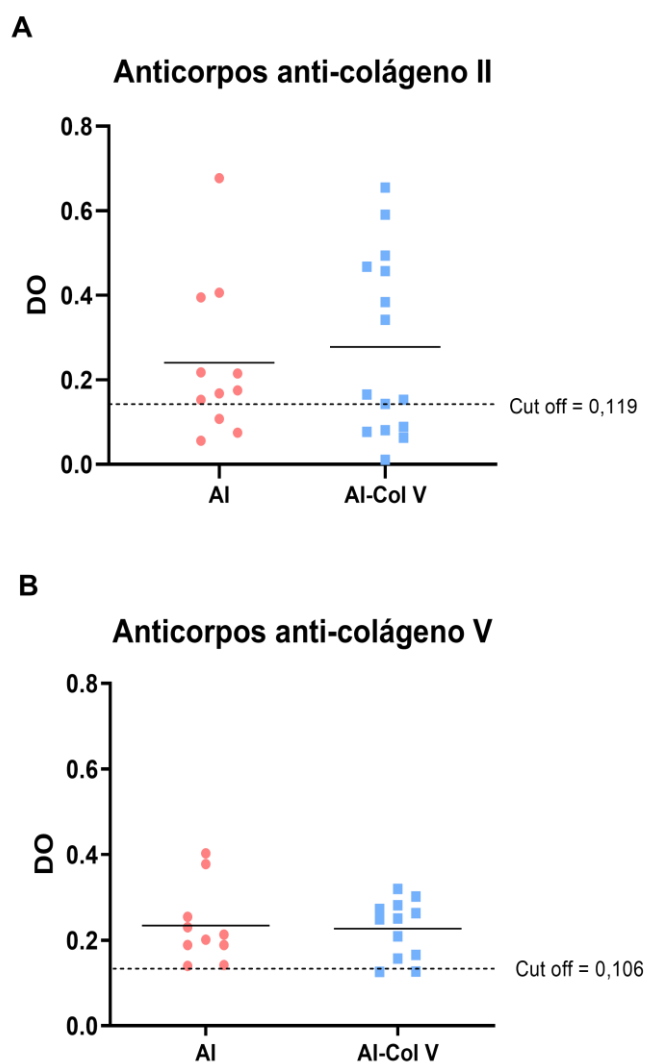


Figura 23 - Pesquisa de anticorpos anticolágeno tipo II (**A**) e V (**B**) no soro dos animais dos grupos **AI** e **AI-Col V**. *GraphPad Prism* versão 8; Teste *t*.

5- DISCUSSÃO

A inflamação no tecido sinovial é um evento comum em várias patologias inflamatórias ou degenerativas, que afetam as articulações sinoviais. Até o momento, o tratamento e o controle da dor e degeneração articular são uma problemática, devido à administração a longo prazo de fármacos ou biológicos, que podem desencadear uma série de efeitos adversos. Considerando estes aspectos, estratégias terapêuticas baseadas em imunoterapia têm sido uma alternativa promissora para promover o potencial tratamento.

O colágeno tipo V tem sido considerado um autoantígeno em potencial, quando exposto ao sistema imunológico, em decorrência de processo inflamatório crônico (43,45,49,50). Acreditamos que durante a inflamação do tecido sinovial, o intenso processo inflamatório e remodelamento tecidual podem expor sítios imunogênicos do colágeno V, com conseqüente desencadeamento de autoimunidade para esta proteína. Baseado nesta hipótese, propusemos a utilização de imunoterapia oral com colágeno tipo V, para avaliar o potencial imunorregulatório e remodelamento do tecido sinovial num modelo de artrite em ratos, induzido pela injeção intra-articular de mBSA. Os nossos resultados mostraram que o grupo de animais com artrite induzida e submetidos a imunoterapia com colágeno tipo V tiveram aumento na expressão de células Treg FoxP3+/IL-10+ e de caspase 3+ no estroma sinovial, indicando um mecanismo imunorregulatório, através produção de IL-10, uma potente citocina anti-inflamatória além de apoptose de células inflamatórias. Aliado a estes resultados, os animais tratados apresentaram aceleração do reparo do tecido sinovial, aumento na produção de colágeno do tipo I e diminuição do tipo V.

Dentre os vários modelos experimentais de artrite encontrados na literatura (23,26,28,31), optamos pela utilização do modelo de artrite induzida por antígeno (mBSA), devido sua grande reprodutibilidade e semelhanças imunológicas, histopatológicas da doença humana e já estabelecido pelo nosso grupo (34).

Os dados obtidos com o PET/CT, aliados à avaliação histológica do 30º dia de artrite, sugerem que a captação de [¹⁸F]FDG é um reflexo do intenso infiltrado de células inflamatórias distribuídas por todo estroma sinovial,

constituído principalmente por linfócitos T (CD4+ e CD8+) e linfócitos B (CD20+), além de uma menor porcentagem de macrófagos (CD68+), presentes no modelo de artrite induzido por mBSA (35). Embora, não tenha sido detectada diferença no escore histológico e porcentagem de células inflamatórias entre os grupos AI e AI-Col V, identificamos, na avaliação histológica, uma importante diferença na distribuição das células imunes. No grupo AI-Col V, estas células foram encontradas ao redor dos vasos e, ao contrário, no grupo AI estavam presentes de forma difusa no tecido sinovial. O padrão morfológico destas células encontrado no grupo AI-Col V, sugere que após a imunoterapia, possivelmente estamos ativando uma resposta imune. Corroborando com esta hipótese, observamos no infiltrado celular que circundam os vasos do estroma sinovial do grupo AI-Col V, maior porcentagem de células Treg FoxP3+/IL-10+, indicando um microambiente imunorregulatório, caracterizado por uma assinatura imunossupressora, através da produção da citocina anti-inflamatória IL-10.

Notavelmente, o tecido sinovial do grupo AI-Col V, que foi caracterizado pelo aumento de células positivas para IL-10, apresenta menor quantidade de colágeno V e maior de colágeno I, indicando que o microambiente anti-inflamatório favorece a aceleração do remodelamento tecidual. Por outro lado, no grupo AI, que apresenta grande quantidade de colágeno V envolvendo o infiltrado celular, apresenta menor quantidade de células FoxP3/IL-10+, indicando um ambiente pró-inflamatório, que resulta em maior dano tecidual e remodelamento tecidual exacerbado (67). Além disso, a administração oral de colágeno do tipo V no modelo de artrite não alterou a expressão de colágeno III entre os grupos AI-Col V e AI, corroborando com a hipótese que o tratamento interferiu na aceleração do reparo tecidual.

A grande quantidade de colágeno tipo V na AI, concomitante ao processo inflamatório, é um aspecto a ser destacado, pois sugere que as células inflamatórias poderiam produzir citocinas e fatores de crescimento, como o TGF- β que estimularia a síntese de colágeno V pelos fibroblastos sinoviais, na tentativa de reparar o dano tecidual. Outros estudos já demonstraram que a expressão do colágeno V precede a expressão do colágeno dos tipos I e III, persistindo até a formação da cicatriz fibrótica em pacientes com esclerose sistêmica precoce (85). Ainda, recentemente foi mostrado que o aumento na

expressão de colágeno V prejudica a organização/formação das fibrilas de colágeno em queloides (86). Além disso, corroborando com a hipótese de que o aumento de colágeno V no processo inflamatório contribui para um remodelamento tecidual exacerbado, podemos citar estudos preliminares do nosso grupo, que demonstram em cultura de fibroblastos humanos normais, aumento da expressão de TGF- β e da expressão gênica das subunidades $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 1\beta 2$ da integrina, após o estímulo com colágeno tipo V. Acreditamos que este colágeno possa ativar a via de sinalização colágeno-membrana celular e, conseqüentemente, ter um papel na ativação dos fibroblastos. (87) A sinalização célula-matriz ocorre através de duas cadeias, a α e a β das integrinas, que atuam na ligação de pelo menos dois sítios nos ligantes da matriz (88,89). A subunidade da integrina $\alpha 2\beta 1$ está presente em células como fibroblastos e possui a capacidade de se ligar ao colágeno dos tipos I, III, IV, V, XI, XVI e XXIII e a proteoglicanos e promover migração celular e mudanças morfológicas nos tecidos.

Outro aspecto relevante é o fato de termos encontrado marcação positiva para caspase 3, colocalizada com o infiltrado de linfócitos T (CD3+) no grupo Al-Col V, indicando que a imunoterapia com colágeno V, provavelmente atua na indução de apoptose de células inflamatórias. Este resultado corrobora com estudos anteriores do nosso grupo, no qual o modelo experimental de artrite, tratado profilaticamente pela administração oral de colágeno V, apresentou aumento da caspase 9 no estroma sinovial (34,35). De fato, tanto a imunoterapia como a tolerância profilática com colágeno V, parecem desencadear a deleção clonal de células inflamatórias, que é um dos mecanismos de imunomodulação, característicos da tolerância periférica para antígenos específicos, administrados pela via da mucosa oral (63–68).

Já está bem estabelecido que o microambiente das mucosas favorece o desenvolvimento da tolerância imunológica periférica, pela presença de células dendríticas tolerogênicas, que produzem altos níveis de IL-10 e TGF- β , enzimas envolvidas no metabolismo do ácido retinóico e transcrição do FoxP3, entre outros fatores (65). Além disso, embora não sejam mutuamente exclusivos, os mecanismos desencadeados pela tolerância oral são, em grande parte, determinados pelo regime de administração do antígeno, onde simples doses

altas de antígeno favorecem a deleção ou anergia clonal, enquanto múltiplas doses baixas de antígeno/autoantígeno estão ligadas com a supressão mediada por células Treg (68,73). Nas últimas décadas vários estudos têm mostrado que a administração oral/nasal de antígenos suprime vários modelos animais de doenças autoimunes, incluindo encefalomielite autoimune experimental, uveíte, tireoidite, miastenia, artrite e diabetes, e também condições inflamatórias não-autoimunes, como asma, aterosclerose, rejeição de enxertos, alergias e derrames (45,51,52,54,56,57,90–92).

Neste estudo, a presença de autoanticorpos anticolágeno V no modelo de artrite reforça a nossa hipótese de que inflamação sinovial expõem epítomos do colágeno V, que ativam a resposta imune humoral. Sabe-se que o colágeno V é uma proteína fibrilar, presente nos tecidos numa proporção de cerca de 2 a 5%, e que se copolimeriza com o colágeno dos tipos I e III para formar fibrilas heterotípicas (I/III/V). A porção tripla hélice helicoidal da molécula de colágeno V encontra-se introduzida no interior das fibrilas heterotípicas, sendo apenas o domínio globular amino terminal (-NH₃) projetado para a superfície (42,43). Além disso, o colágeno do tipo V destaca-se por possuir propriedades imunogênicas, antigênicas e pelo potencial de tornar-se um autoantígeno quando exposto, pela ação de metaloproteases ou outros agentes indutores da lesão tecidual crônica (45,51,52). Pela sua localização no interior das fibrilas heterotípicas, o colágeno V foi considerado um antígeno oculto, responsável pela autoimunidade em patologias como a bronquiolite obliterante, decorrente de transplante de pulmão em modelo murino e em humanos, fibrose pulmonar idiopática, aterosclerose e em asma de hipersensibilidade; e, ao contrário, a indução de tolerância oral/nasal com o colágeno V preveniu o desencadeamento dos processos patológicos em modelos experimentais destas doenças (45,51,52,54,56,90–92). Mais recentemente, um estudo clínico fase 1 demonstrou que pacientes com fibrose pulmonar idiopática submetidos a imunoterapia oral com doses de 1,0 mg de colágeno V, diariamente por 30 dias, tiveram uma estabilização da função pulmonar (57).

Baseados em dados da literatura, acreditamos que no modelo de artrite, a primeira injeção de emulsão de mBSA em adjuvante de *Freund* completo, que contém *Mycobacterium tuberculosis* inativado, estimula o sistema imunológico,

resultando em um influxo de macrófagos, linfócitos, bem como a formação de complexos imunes de mBSA/anti-mBSA, que aumentam com os reforços de mBSA subsequentes (93). Portanto, nesse microambiente inflamatório, os macrófagos ativados produzem uma variedade de substâncias lesivas ao estroma sinovial, como metabólitos tóxicos de oxigênio, proteases (metaloproteases) e óxido nítrico (94). Além disso, os complexos imunes mBSA/anti-mBSA ativam o sistema complemento, aumentando a inflamação e a lesão sinovial (93,95). Em consequência da inflamação e remodelamento do estroma sinovial, sítios imunogênicos do colágeno do tipo V podem ser expostos, desencadeando uma resposta imunológica para esta proteína. Nossos resultados prévios corroboram com esta hipótese, uma vez que também foram detectados autoanticorpos anticolágeno V nos animais com a indução de artrite pela injeção intra-articular de mBSA (34). Como mencionado anteriormente, a presença de anticorpos anticolágeno V detectados nos animais com artrite neste estudo são mais um indício de que o colágeno tipo V se torna um autoantígeno potencial. Ainda, encontramos positividade para anticorpos anticolágeno II, o que corrobora com a literatura, uma vez que já foi detectado em pacientes com artrite, relacionado com a destruição articular e produção de citocinas pró-inflamatórias na fase precoce da doença, podendo ser considerado um parâmetro de prevenção de danos articulares que podem ocorrer posteriormente (96–99).

A partir da hipótese de que o colágeno tipo V se torna um autoantígeno na artrite induzida por mBSA, consideramos que a imunoterapia com esta proteína poderia desencadear um ambiente imunorregulatório no tecido sinovial, e indiretamente trazer benefício à inflamação articular. A administração de antígenos pela via oral para induzir células T reguladoras periféricas aproveita os mecanismos regulatórios que o trato gastrointestinal utiliza para promover a insensibilidade contra antígenos alimentares ou microrganismos comensais (71). De acordo com a literatura, consideramos que o colágeno tipo V, administrado pela via oral, passe pelo trato digestivo dos animais e porções desta proteína (peptídeos) sejam absorvidas na mucosa do intestino delgado por difusão paracelular ou endocitose através das células M (*microfold*) nas placas de Peyer, o qual provavelmente é capturado por células dendríticas (CD11cCD103+), que migram para os nódulos linfáticos, através de um mecanismo dependente de

receptores de quimiocina 7 (CCR7) (66–68,100). Nos nódulos linfáticos mesentéricos, as células dendríticas clássicas (CD103+ CD11b-) induzem a diferenciação de células T nativas, específicas para o colágeno V, em células Tregs, através de mecanismos dependentes de TGF- β e ácido retinóico (100). Ainda, as células dendríticas CD103+ expressam altos níveis da enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), que está envolvida na indução do fator de transcrição FoxP3+ nas células Tregs. O ácido retinóico aumenta a expressão do receptor de quimiocina (CCR9) e integrina $\alpha 4\beta 7$ nas células Tregs recém diferenciadas, os quais induzem o processo de migração destas células para a lâmina própria do intestino. Na lâmina própria, as células dendríticas CX3CR1+, produzem grande quantidade de IL-10, importante para a expansão clonal de células Tregs (66–68). Estas células Tregs, desencadeadas pelo mecanismo de tolerância para colágeno V, provavelmente migram da lâmina própria do intestino para o local de lesão, o estroma sinovial, e liberam a citocina anti-inflamatória IL-10. Acreditamos que este mecanismo possa ter sido desencadeado nos animais do modelo de artrite, submetidos a imunoterapia oral com colágeno tipo V, o qual induziu um perfil de células Tregs FoxP3+ / IL-10+ no estroma sinovial do grupo AI-Col V.

Um fato que chama a atenção é a grande porcentagem de células que expressam IL-10, no grupo dos animais com artrite induzida e submetidos a imunoterapia oral com colágeno tipo V. Importante mencionar que, além das células Tregs, que expressam FoxP3+ e citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, TGF- β , IL-35, a tolerância induzida oralmente pela administração de antígenos inclui outros tipos de células Treg FoxP3-, como as LAP+ Treg e Tr1. As LAP+ Treg expressam CD4 e LAP e secretam tanto TGF- β quanto IL-10. As células Tr1 expressam CD4, CD49b, LAG-3 e alta secreção de IL-10 (66,71,101). Além disso, atualmente, têm sido mostradas células induzidas por tolerância oral, com função regulatória, diferentes de linfócitos T CD4+. Neste sentido, têm sido caracterizados vários subtipos de células B regulatórias (Breg), e a maioria produz uma grande quantidade IL-10 (102,103). De fato, as funções imunossupressoras do subtipo de células Breg B10 foram intensamente caracterizadas em diferentes modelos de doenças, como inflamação alérgica, inflamação intestinal, encefalomielite autoimune experimental, artrite e lúpus

(103). Embora em nosso estudo, ainda não tenhamos caracterizado outros perfis de células que expressam IL-10, no grupo AI-Col V, acreditamos que além do perfil de células Tregs FoxP3+ / IL-10+, a IL-10 deve ser também produzida por outros tipos de células, que serão caracterizadas em estudos futuros.

Em suma, no nosso estudo mostramos que a imunoterapia oral com colágeno V no modelo de artrite induzida por mBSA, induziu um microambiente imunoregulatório no estroma sinovial, caracterizado pela presença de células Treg FoxP3+/IL-10+ e aumento de apoptose de células inflamatórias. Como consequência do microambiente anti-inflamatório, o estroma sinovial dos animais com AI, submetidos a imunoterapia com colágeno V, apresentou aceleração do reparo do tecido sinovial, regulado pelo aumento no depósito de colágeno I e diminuição de colágeno do V. Ainda, destacamos a importância do monitoramento *in vivo* da captação de [¹⁸F]FDG pelo PET/CT, que reflete o metabolismo da glicose e, indiretamente, sinalizou o infiltrado celular na articulação nos animais dos nossos grupos de estudo.

O conjunto dos nossos dados sugerem que a imunoterapia com colágeno V favoreceu um ambiente anti-inflamatório e remodelamento sinovial, podendo ser considerada uma terapêutica promissora, coadjuvante aos tratamentos de base em doenças articulares.

CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

Baseados nos resultados encontrados durante o desenvolvimento desse trabalho, em que foi verificada uma importante diferença na distribuição das células imunes, aumento de células Treg FoxP3+/IL-10+, colágeno I e diminuição de colágeno V no tecido sinovial, após a imunoterapia com colágeno V na artrite em ratos, podemos concluir que:

1. O tratamento teve efeito imunorregulatório na artrite experimental em ratos.
2. A imunomodulação desenvolvida nos animais tratados foi mediada por células Treg e citocina IL-10 no tecido sinovial.
3. O tecido sinovial apresentou sinais de reparação, com remodelamento de colágeno.

Desta forma, sugerimos que:

1. A terapia com colágeno V pode vir a ser um tratamento promissor aliado aos medicamentos de doenças articulares.
2. Anticorpos anticolágeno V poderiam ser utilizados como um biomarcador do processo inflamatório articular em pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raleigh AR, W.J. McCarty, Chen AC, Meinert C, Klein TJ, Sah RL. 6.7 Synovial Joints: Mechanobiology and Tissue Engineering of Articular Cartilage and Synovial Fluid. *Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier; 2017. p. 107–34.
2. Pap T, Dankbar B, Wehmeyer C, Korb-Pap A, Sherwood J. Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*. 2020; 101:140–5.
3. Burke CJ, Alizai H, Beltran LS, Regatte RR. MRI of synovitis and joint fluid. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2019; 49(6):1512–27.
4. Shanaj S, Donlin LT. Synovial Tissue: Cellular and Molecular Phenotyping. *Curr Rheumatol Rep*. 2019; 21(10):1–6.
5. Smith MD. The normal synovium. *Open Rheumatol J*. 2011; 5:100–6.
6. Acanfora C, Bruno F, Palumbo P, Arrigoni F, Natella R, Mazzei MA, et al. Diagnostic and interventional radiology fundamentals of synovial pathology. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*. 2020; 91(Suppl 8):107.
7. Frick MA, Wenger DE, Adkins M. MR Imaging of Synovial Disorders of the Knee: An Update. *Radiol Clin North Am*. 2007; 45(6):1017–31.
8. Radu AF, Bungau SG. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells*. 2021; 10(11):2857.
9. 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.

10. Orr C, Sousa E, Boyle DL, Buch MH, Buckley CD, Cañete JD, et al. Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nature Reviews Rheumatology*. 2017; 13(8):463–75.
11. Weyand CM, Goronzy JJ. The immunology of rheumatoid arthritis. *Nature Immunology*. 2020; 22(1):10–8.
12. van Kuijk AWR, Tak PP. Synovitis in Psoriatic Arthritis: Immunohistochemistry, Comparisons With Rheumatoid Arthritis, and Effects of Therapy. *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13(4):353.
13. FitzGerald O, Ogdie A, Chandran V, Coates LC, Kavanaugh A, Tillett W, et al. Psoriatic arthritis. *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1. 2021; 7(1):1–17.
14. Mathew AJ, Ravindran V. Infections and arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014; 28(6):935–59.
15. Ross JJ. Septic Arthritis of Native Joints. *Infect Dis Clin North Am*. 2017; 31(2):203–18.
16. White CM, Kesler WW, Miner L, Flemming D. MR Imaging Knee Synovitis and Synovial Pathology. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2022; 30(2):277–91.
17. Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*. 2017; 19(1).
18. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2018; 40(3):193–200.

19. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2009; 39(8):2040–4.
20. Donaldson LF, Chillingworth NL. Arthritis Model, Adjuvant-Induced Arthritis. *Encyclopedia of Pain*. 2007; 111–5.
21. Gao W, Wang D, Yang X, Pan T, Chai X, Zhang Z. Hong-Hui-Xiang Alleviates Pain Hypersensitivity in a Mouse Model of Monoarthritis. *Pain Res Manag*. 2020; 2020:5626948.
22. McDougall JJ, McKenna MK. Anti-Inflammatory and Analgesic Properties of the Cannabis Terpene Myrcene in Rat Adjuvant Monoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(14).
23. Berke MS, Colding-Jørgensen P, Hestehave S, Kalliokoski O, Jensen HE, Sørensen DB, et al. Effects of buprenorphine on acute pain and inflammation in the adjuvant-induced monoarthritis rat model. *Heliyon*. 2022; 8(11):e11554.
24. Muley MM, Krustev E, Mcdougall JJ. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. *CNS Neurosci Ther*. 2016; 22(2):88–101.
25. Martínez-Hernández GB, Vargas-Villa G, Jiménez-Ferrer E, García-Aguilar MP, Zamilpa A, Román-Ramos R, et al. Anti-arthritic and anti-inflammatory effects of extract and fractions of *Malva parviflora* in a mono-arthritis model induced with kaolin/carrageenan. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020; 393(7):1281–91.
26. Gutiérrez-Román AS, Trejo-Tapia G, González-Cortazar M, Jiménez-Ferrer E, Trejo-Espino JL, Zamilpa A, et al. Anti-arthritic and anti-inflammatory effects of *Baccharis conferta* Kunth in a kaolin/carrageenan-induced monoarthritis model. *J Ethnopharmacol*. 2022; 288:114996.

27. Yu YC, Koo ST, Kim CH, Lyu Y, Grady JJ, Chung JM. Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis. *J Neurosci Methods*. 2002; 115(1):107–13.
28. Logashina YA, Palikova YA, Palikov VA, Kazakov VA, Smolskaya S v., Dyachenko IA, et al. Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of TRPV1 Polypeptide Modulator APHC3 in Models of Osteo- and Rheumatoid Arthritis. *Mar Drugs*. 2021; 19(1):39.
29. Ängeby Möller K, Klein S, Seeliger F, Finn A, Stenfors C, Svensson CI. Monosodium iodoacetate-induced monoarthritis develops differently in knee versus ankle joint in rats. *Neurobiology of Pain*. 2019; 6:100036.
30. Guazelli CFS, Staurengo-Ferrari L, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Ruiz-Miyazawa KW, Vicentini FTMC, et al. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 102:175–84.
31. Falcão TR, Rodrigues CAO, de Araújo AA, de Medeiros CACX, Soares LAL, Ferreira MRA, et al. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2019;19(1):47.
32. Djuichou Nguemnang SF, Tsafack EG, Mbiantcha M, Gilbert A, Atsamo AD, Yousseu Nana W, et al. In Vitro Anti-Inflammatory and In Vivo Antiarthritic Activities of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Dissotis thollonii* Cogn. (Melastomataceae) in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019; 2019:3612481.
33. Chandrupatla DMSH, Molthoff CFM, Ritsema WIGR, Vos R, Elshof E, Matsuyama T, et al. Prophylactic and therapeutic activity of alkaline phosphatase in arthritic rats: single-agent effects of alkaline phosphatase and synergistic effects in combination with methotrexate. *Translational*

- Research. 2018; 199:24–38.
34. Atayde S, Velosa A, Catanozi S, Del Bianco V, Andrade P, Rodrigues J, et al. Collagen V oral administration decreases inflammation and remodeling of synovial membrane in experimental arthritis. *PLoS One*. 2018; 13(7):e0201106.
 35. McNamee K, Williams R, Seed M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? *Eur J Pharmacol*. 2015; 759:278–86.
 36. Hasegawa T, Hirasawa N, Watanabe M, Arakawa M, Tsurufuji S, Ohuchi K. Characterization of methylated bovine serum albumin-induced allergic inflammation in rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1991; 95(1):35–41.
 37. Chen X, Andresen B, Hill M, Zhang J, Booth F, Zhang C. Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction. *Curr Hypertens Rev*. 2008; 4(4):245–55.
 38. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol*. 1988; 106(3):999–1008.
 39. Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens. Controlling elements in corneal morphogenesis? *Ann N Y Acad Sci*. 1990; 580:143–60.
 40. Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K, Arima M. Localization of Type V Collagen and Type IV Collagen in Human Cornea, Lung, and Skin Immunohistochemical Evidence by Anti-Collagen Antibodies Characterized by Immunoelectroblotting. *Am J Pathol*. 1984; 116(3):417–26.
 41. Adachi E, Hayashi T, Hashimoto PH. A comparison of the

- immunofluorescent localization of collagen types I, III, and V with the distribution of reticular fibers on the same liver sections of the snow monkey (*Macaca fuscata*). *Cell Tissue Res.* 1991; 264(1):1–8.
42. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci.* 1990; 95 (Pt 4):649–57.
 43. Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler LI, et al. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol.* 1993; 121(5):1181–9.
 44. Adachi E, Hayashi T. In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect Tissue Res.* 1986; 14(4):257–66.
 45. Mares DC, Heidler KM, Smith GN, Cummings OW, Harris ER, Foresman B, et al. Type V Collagen Modulates Alloantigen-Induced Pathology and Immunology in the Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 23(1):62–70.
 46. Asgari M, Latifi N, Heris HK, Vali H, Mongeau L. In vitro fibrillogenesis of tropocollagen type III in collagen type I affects its relative fibrillar topology and mechanics. *Sci Rep.* 2017;7(1):1392.
 47. Andrikopoulos K, Liu X, Keene DR, Jaenisch R, Ramirez F. Targeted mutation in the *col5a2* gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. *Nat Genet.* 1995; 9(1):31–6.
 48. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55(12):1531–46.
 49. Chanut-Delalande H, Bonod-Bidaud C, Cogne S, Malbouyres M, Ramirez

- F, Fichard A, et al. Development of a Functional Skin Matrix Requires Deposition of Collagen V Heterotrimers. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(13):6049–57.
50. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20(5):495–501.
51. Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, Smith GN, Cummings OW, Foresman BH, et al. Oral Tolerance Induction by Type V Collagen Downregulates Lung Allograft Rejection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25(1):26–34.
52. Haque M, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz R, Zheng Y, et al. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol.* 2002; 169(3):1542-9.
53. Vittal. Transfer of Tolerance to Collagen Type V Suppresses T-Helper-Cell-17 Lymphocyte-Mediated Acute Lung Transplant Rejection. *Transplantation.* 2009; 88(12):1341–8.
54. Yamada Y, Sekine Y, Yoshida S, Yasufuku K, Petrache I, Benson HL, et al. Type V Collagen-Induced Oral Tolerance Plus Low-Dose Cyclosporine Prevents Rejection of MHC Class I and II Incompatible Lung Allografts. *The Journal of Immunology.* 2009; 183(1):237–45.
55. Vittal. Interleukin-17–Dependent Autoimmunity to Collagen Type V in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2010; 107(9):1106–16.
56. Vittal R, Mickler EA, Fisher AJ, Zhang C, Rothhaar K, Gu H, et al. Type V Collagen Induced Tolerance Suppresses Collagen Deposition, TGF- β and Associated Transcripts in Pulmonary Fibrosis. *PLoS One.* 2013; 8(10):e76451.

57. Wilkes DS, Chew T, Flaherty KR, Frye S, Gibson KF, Kaminski N, et al. Oral immunotherapy with type V collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2015; 45(5):1393–402.
58. Park AC, Huang G, Jankowska-Gan E, Massoudi D, Kernien JF, Vignali DA, et al. Mucosal Administration of Collagen V Ameliorates the Atherosclerotic Plaque Burden by Inducing Interleukin 35-dependent Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 291(7):3359–70.
59. Callado MRM, Viana VST, Vendramini MBG, Leon EP, Bueno C, Velosa APP, et al. Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology*. 2007; 122(1):38–46.
60. Velosa APP, Teodoro WR, de Oliveira CC, dos Santos Filho A, Moutinho RF, Santos AG, et al. Collagen V nasal tolerance in experimental model of systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res*. 2007; 299(4):177–89.
61. Teodoro WR, de Jesus Queiroz ZA, dos Santos LA, Catanozi S, dos Santos Filho A, Bueno C, et al. Proposition of a novel animal model of systemic sclerosis induced by type V collagen in C57BL/6 mice that reproduces fibrosis, vasculopathy and autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 2019; 21(1).
62. Stuart JM, Huffstutter EH, Townes AS, Kang AH. Incidence and specificity of antibodies to types I, II, III, IV, and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases as measured by ¹²⁵I-radioimmunoassay. *Arthritis Rheum*. 1983; 26(7):832–40.
63. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*. 2001; 3(11):947–54.

64. Faria AMC, Weiner HL. Oral Tolerance: Therapeutic Implications for Autoimmune Diseases. *Clin Dev Immunol*. 2006; 13(2–4):143–57.
65. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol*. 2001; 2(8):671–2.
66. Wambre E, Jeong D. Oral Tolerance Development and Maintenance. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018;38(1):27–37.
67. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018; 55(2):107–17.
68. Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol*. 2017; 30:3–11.
69. Pallotta MT, Rossini S, Suvieri C, Coletti A, Orabona C, Macchiarulo A, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1): an up-to-date overview of an eclectic immunoregulatory enzyme. *FEBS J*. 2022; 289(20):6099.
70. Gargaro M, Scalisi G, Manni G, Briseño CG, Bagadia P, Durai V, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 activation in mature cDC1 promotes tolerogenic education of inflammatory cDC2 via metabolic communication. *Immunity*. 2022; 55(6):1032.
71. Bertolini TB, Biswas M, Terhorst C, Daniell H, Herzog RW, Piñeros AR. Role of orally induced regulatory T cells in immunotherapy and tolerance. *Cell Immunol*. 2021; 359:104251.
72. Pinheiro-Rosa N, Torres L, Oliveira M de A, Andrade-Oliveira MF, Guimarães MA de F, Coelho MM, et al. Oral tolerance as antigen-specific immunotherapy. *Immunotherapy Advances*. 2021; 1(1):1–21.
73. Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, al-Sabbagh A, Santos L, et

- al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:809–37.
74. Tong T, Zhao W, Wu YQ, Chang Y, Wang QT, Zhang LL, et al. Chicken type II collagen induced immune balance of main subtype of helper T cells in mesenteric lymph node lymphocytes in rats with collagen-induced arthritis. *Inflammation Research.* 2010; 59(5):369–77.
75. Thomé R, Fernandes LGR, Mineiro MF, Simioni PU, Joazeiro PP, Tamashiro WM da SC. Oral tolerance and OVA-induced tolerogenic dendritic cells reduce the severity of collagen/ovalbumin-induced arthritis in mice. *Cell Immunol.* 2012; 280(1):113–23.
76. Chen L, Bao B, Wang N, Xie J, Wu W. Oral administration of shark type II collagen suppresses complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Pharmaceuticals.* 2012; 5(4):339–52.
77. Teodoro WR, Miron BG, Tsuzuki L, Ogido I, Velosa AP, Abatepaulo F, et al. Synovial Remodeling Process Induced by Type V Collagen Immunization in Rabbits. *Pathol Res Pract.* 2003; 199(9):605–12.
78. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, et al. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract.* 2004; 200(10):681–91.
79. Bezerra MC, Teodoro WR, de Oliveira CC, Velosa APP, Ogido LTI, Gauditano G, et al. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen. *Arch Dermatol Res.* 2006; 298(2):51–7.
80. Ogido LTI, Teodoro WR, Velosa APP, de Oliveira CC, Parra ER, Capelozzi VL, et al. Abnormal collagen deposition in synovia after collagen type V

- immunization in rabbits. *Histol Histopathol.* 2008; 23(3):263–9.
81. Velosa APP, Teodoro WR, dos Anjos DM, Konno R, Oliveira CC, Katayama ML, et al. Collagen V-induced nasal tolerance downregulates pulmonary collagen mRNA gene and TGF-beta expression in experimental systemic sclerosis. *Respir Res.* 2010; 11(1):11–1.
 82. Spelta LEW, Real CC, Buchpiguel CA, de Paula Faria D, Marcourakis T. [18F]FDG brain uptake of C57Bl/6 male mice is affected by locomotor activity after cocaine use: A small animal positron emission tomography study. *J Neurosci Res.* 2022; 100(10):1876–89.
 83. Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B, et al. Synovitis score: Discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology.* 2006; 49(4):358–64.
 84. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96(10):857–81.
 85. Liu T, Zhang J. Detection of V, III and I type collagens of dermal tissues in skin lesions of patients with systemic sclerosis and its implication. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science.* 2008; 28(5):599–603.
 86. Zhou B, Tu T, Gao Z, Wu X, Wang W, Liu W. Impaired collagen fibril assembly in keloids with enhanced expression of lumican and collagen V. *Arch Biochem Biophys.* 2021; 697:108676.
 87. Mendes I, Carrasco S, Moreira A, Velosa A, Goldenstein-Schainberg C, Frediane D, et al. Collagen V stimulates TGF-Beta and endothelin-I expression in human fibroblasts and endothelial cells. *Journal of Scleroderma and Related Disorders.* 2018; 63–4.

88. Pollard TD, Earnshaw WC. *Biologia Celular*. 1º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
89. Ruggiero F, Champlaud MF, Garrone R, Aumailley M. Interactions between Cells and Collagen V Molecules or Single Chains Involve Distinct Mechanisms. *Exp Cell Res*. 1994; 210(2):215–23.
90. Braun RK, Molitor-Dart M, Wigfield C, Xiang Z, Fain SB, Jankowska-Gan E, et al. Transfer of tolerance to collagen type v suppresses T-helper-cell-17 lymphocyte-mediated acute lung transplant rejection. *Transplantation*. 2009; 88(12):1341–8.
91. Dart ML, Jankowska-Gan E, Huang G, Roenneburg DA, Keller MR, Torrealba JR, et al. Interleukin-17-dependent autoimmunity to collagen type v in atherosclerosis. *Circ Res*. 2010; 107(9):1106–16.
92. Park AC, Huang G, Jankowska-Gan E, Massoudi D, Kernien JF, Vignali DA, et al. Mucosal Administration of Collagen V Ameliorates the Atherosclerotic Plaque Burden by Inducing Interleukin 35-dependent Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 291(7):3359–70.
93. Barton NJ, McQueen DS, Thomson D, Gauldie SD, Wilson AW, Salter DM, et al. Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. *Exp Mol Pathol*. 2006; 81(2):166–70.
94. Janeway CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *The Immune System in Health and Disease*. 5o ed. New York: Garland Science; 2001.
95. Kehoe O, Cartwright A, Askari A, El Haj AJ, Middleton J. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *J Transl Med*. 2014; 12(1).
96. Abed H, Abed HA, Mahmood HG, Al-Osami MH. Association between anti-

- collagen type II autoantibodies and the acute rheumatoid arthritis phenotype in a cohort of rheumatoid arthritis patients. *Biomedical Research and Therapy*. 2022; 9(4):5023–8.
97. Berntson L, Nordal E, Fasth A, Aalto K, Herlin T, Nielsen S, et al. Anti-type II collagen antibodies, anti-CCP, IgA RF and IgM RF are associated with joint damage, assessed eight years after onset of juvenile idiopathic arthritis (JIA). *Pediatr Rheumatol Online J*. 2014; 12(1):22.
 98. Choi EKK, Gatenby PA, McGill NW, Bateman JF, Cole WG, York JR. Autoantibodies to type II collagen: Occurrence in rheumatoid arthritis, other arthritides, autoimmune connective tissue diseases, and chronic inflammatory syndromes. *Ann Rheum Dis*. 1988; 47(4):313–22.
 99. Mullazehi M, Wick MC, Klareskog L, van Vollenhoven R, Rönnelid J. Anti-type II collagen antibodies are associated with early radiographic destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012; 14(3):1–7.
 100. Esterházy D, Loschko J, London M, Jove V, Oliveira TY, Mucida D. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and tolerance. *Nat Immunol*. 2016; 17(5):545–55.
 101. Wang X, Sherman A, Liao G, Leong KW, Daniell H, Terhorst C, et al. Mechanism of oral tolerance induction to therapeutic proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65(6):759-73.
 102. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguillón JC, et al. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front Immunol*. 29 de 2021; 12:611795.
 103. Jansen K, Cevhertas L, Ma S, Satitsuksanoa P, Akdis M, van de Veen W. Regulatory B cells, A to Z. *Allergy*. 2021; 76(9):2699-2715.