

## PROKNEE® 40 COLLAGEN II

## DESCRIÇÃO

Proknee® 40 Collagen II é um ingrediente padronizado de colágeno tipo II não desnaturado, obtido da cartilagem do esterno do frango.

Composição química com caracterização molecular

Nomenclatura química: fragmento de colágeno tipo II

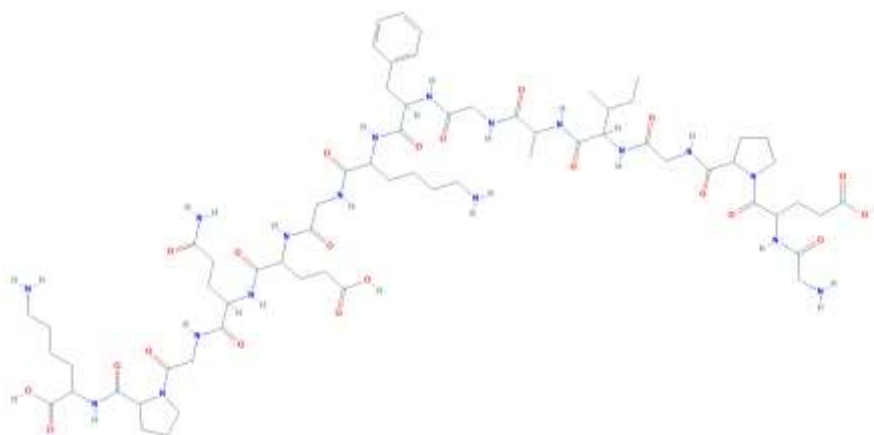
Nomenclatura IUPAC: glycyl-DL-alpha-glutamyl-DL-prolyl-glycyl-DL-isoleucyl-DL-alanyl-glycyl-DL-phenylalanyl-DL-lysyl-glycyl-DL-alpha-glutamyl-DL-glutaminyl-glycyl-DL-prolyl-DL-lysine

Nomenclatura IUPAC condensada: H-Gly-DL-Glu-DL-Pro-Gly-DL-xille-DL-Ala-Gly-DL-Phe-DL-Lys-Gly-DL-Glu-DL-Gln-Gly-DL-Pro-DL-Lys-OH

Fórmula molecular: C<sub>65</sub>H<sub>102</sub>N<sub>18</sub>O<sub>21</sub>

Peso molecular: 1471.6 g/mol

Estrutura química:



A molécula de colágeno tem 280 nm de comprimento, com massa molecular de 300.000 Da estabilizada por pontes de hidrogênio e por ligações intermoleculares<sup>1</sup>.

Especificação: Proknee® 40 Collagen II é um pó branco ou amarelado obtido de esterno fresco de frango. O total de colágeno desse ingrediente é  $\geq 25.0\%$  (determinado pelo método de Kjeldahl) e o teor do composto bioativo colágeno tipo II não desnaturado é de  $\geq 3.0\%$  (determinado pelo método ELISA *sandwich*).



Descrição da metodologia analítica para avaliação de Proknee® 40 Collagen II:

Para quantificar o teor de colágeno tipo II não desnaturado presente no ingrediente é realizado o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay Test (ELISA) sandwich*, o qual foi desenhado para mensurar a quantidade de colágeno tipo II nativo solubilizado a partir de várias espécies, incluindo o frango. Esse kit de detecção de colágeno tipo II ELISA é específico para colágeno nativo e possui pouca reatividade com colágeno desnaturado.

## INTRODUÇÃO

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado, composto por células, os condrócitos, e um conjunto de macromoléculas, como o colágeno e os proteoglicanos. O colágeno é uma proteína fibrilar que garante resistência ao tecido, enquanto os proteoglicanos tem a função de mola biológica, sendo responsáveis pela compressibilidade da cartilagem. A complexa interação entre estas duas proteínas garante a elasticidade. Estas características específicas da cartilagem são essenciais para amortecer as grandes forças de impacto a que as articulações diartrodiais estão submetidas, sem muito gasto de energia, visto tratar-se de um tecido avascular<sup>2</sup>.

Os condrócitos presentes em pequenas proporções na cartilagem (cerca de 5%), são consideradas o centro metabólico e produtor da vasta matriz extracelular encontrada na cartilagem, composta basicamente por água, proteoglicanos, colágeno e outras proteínas. A água representa cerca de 65% a 85% do peso seco do tecido, enquanto as principais macromoléculas, como o colágeno e os proteoglicanos, representam cerca de 10% a 30% do peso seco do tecido, respectivamente<sup>2</sup>.

O colágeno tipo II é a mais abundante proteína fibrilar presente na cartilagem, com pelo menos dez colágenos adicionais, incluindo os tipos III, VI, IX, X, XI e XIII, presentes como menores constituintes. Sabe-se que além da função de suporte, participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular, exercendo também atividade antigênica<sup>3</sup>.

O condrócito sofre a ação reguladora de mediadores pré-catabólicos, metaloproteinases e citocinas, que promovem a degradação cartilaginosa e pró-anabólicos, fatores de crescimento que ativam mecanismos de regeneração. Os principais agentes da degradação cartilaginosa são as metaloproteinases (MMPs) e enzimas zinco-dependentes, que são distribuídas em três grupos: collagenase, gelatinase e estromelina; para bloquear suas ações, temos os inibidores tissulares das MMP. Das citocinas, destaque-se a ação catabólica da interleucina-1 (a mais importante), da interleucina-6 e do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Dos fatores anabólicos, destaquem-se as ações do insulina like growth factor-I (IGF-I) e do transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) na formação de cartilagem articular e na síntese de proteoglicanos<sup>4</sup>.



O envelhecimento cartilaginoso traz consigo um menor poder de agregação dos proteoglicanos, aliado à menor resistência mecânica da cartilagem.

A cartilagem tem uma capacidade reparadora limitada, que mais ainda se estreita com o envelhecimento e/ou quando da eclosão de condições degenerativas<sup>5</sup>.

Muitas das características físico-químicas da matriz extracelular da cartilagem se devem aos proteoglicanos, seu principal constituinte. Tais moléculas é que capacitam a cartilagem a suportar cargas compressivas amplamente variáveis, além de influenciarem diretamente a atividade dos condrócitos.

Muitas das interações biológicas decorrem das cadeias de glucosaminoglicanos (principalmente cadeias de sulfato de condroitina), unidas por ligação covalente a núcleos proteicos. O principal tipo de proteoglicano presente na cartilagem é o agrecano, constituído por um núcleo proteico no qual se aderem muitas cadeias de sulfato de condroitina, com predomínio daquelas 4- ou 6-sulfatadas.

Com o envelhecimento da cartilagem, reconhecem-se muitas alterações na estrutura do agrecano e dos agregados multimoleculares que ele forma com o hialuronato, fruto de processos anabólicos e catabólicos, geridos por eventos celulares e extracelulares, numa extensão que varia segundo o tipo, articulação, local e profundidade considerada. Assim, a síntese e o “turnover” de agregados sofrem influência da idade e do local de origem (por exemplo, ela não é a mesma na cartilagem e no menisco do mesmo joelho). A função reparadora dos condrócitos diminui progressivamente com a idade, o que é demonstrado por uma síntese decrescente de agrecanos, e por menor capacidade para a formação de agregados moleculares de grande tamanho. De longe, contudo, é a idade do indivíduo a principal responsável pela composição da cartilagem. Compreendem-se assim o motivo de serem as doenças articulares as mais frequentes na velhice. Estudos em cartilagem humana femoral mostram que alterações em sua composição química são mais pronunciadas do nascimento até os 20 anos de idade, período em que diminui o conteúdo dos dissacarídeos 4-sulfatos. Com o progredir da idade, diminui-se a espessura da cartilagem e a composição predominante passa a ser de 6-sulfatos. Com referência ao sexo, sabe-se que o volume da cartilagem dos joelhos é muito maior no homem do que na mulher e, com o envelhecimento ela se acentua mais ainda, sugerindo que essa diferença sexual decorra tanto do desenvolvimento da cartilagem quanto de sua perda na velhice<sup>6</sup>.

## OSTEOARTRITE

Osteoartrite é o mesmo que osteoartrose, artrose ou doença articular degenerativa.



A osteoartrite (OA) é uma doença de alta prevalência em todo o mundo, uma importante causa de dor crônica e de incapacidade funcional. Além de apresentar um impacto negativo no bem-estar físico e emocional das pessoas acometidas, a OA está associada a uma elevada taxa de utilização de recursos de saúde e altos custos de tratamento, o que impacta toda a sociedade<sup>7</sup>.

A resposta da cartilagem articular normal à injúria ou degeneração é vista como uma tentativa de reparação ineficiente; as propriedades bioquímicas e mecânicas do novo tecido diferem da cartilagem original, resultando numa função inadequada ou alterada.

O dano à integridade da cartilagem articular, é resultante de uma alteração no balanço entre processos anabólicos e catabólicos que ocorrem nos condrócitos e no líquido sinovial das articulações<sup>8</sup>.

A degradação da cartilagem é considerada a característica central na osteoartrite; a perda da homeostase da cartilagem resulta na degradação do colágeno e dos proteoglicanos levando à erosão da articulação. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) podem causar uma variedade de alterações envolvidas na etiopatogenia da osteoartrite (OA), incluindo degradação da matriz extracelular, inibição da autofagia dos condrócitos e promoção da apoptose de condrócitos<sup>9</sup>.

A osteoartrose quando não tem uma causa definida ou estabelecida é classificada como primária, ou pode ser secundária quando decorre de forças anômalas aplicadas em articulações saudáveis ou forças normais aplicadas em articulações primariamente comprometidas.

### **METABOLISMO NA CARTILAGEM OSTEOARTRÓTICA**

O condrócito sofre a ação reguladora de dois tipos de mediadores: os pró-catabólicos (citocinas) e os pró-anabólicos (fatores de crescimento), que, através de liberação parácrina e/ou autócrina, podem promover junto ao condrócito a ativação de mecanismos que resultam na degradação ou regeneração da cartilagem.

A degradação na cartilagem articular é mediada principalmente por enzimas zinco-dependentes, denominadas metaloproteinases (MMPs). Existem três grupos de metaloproteinases: colagenase, gelatinase e estromelina; estas enzimas são ativas em pH neutro e podem digerir sinergicamente todas as macromoléculas da matriz. Os mais importantes agentes inibitórios das metaloproteinases são os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP1, TIMP2 e TIMP3), que se ligam à forma ativa da enzima, formando complexos na proporção de 1:1, e, deste modo, bloqueando sua atividade<sup>10</sup>. No processo artrósico existe um desequilíbrio entre a produção de metaloproteinases e seus inibidores havendo aumento de metaloproteinases e decréscimo nos níveis de TIMP o que contribui para a degradação enzimática da cartilagem<sup>11</sup>.

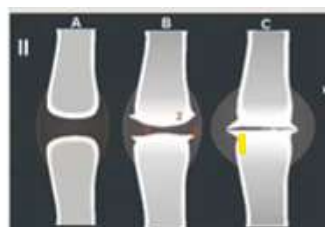
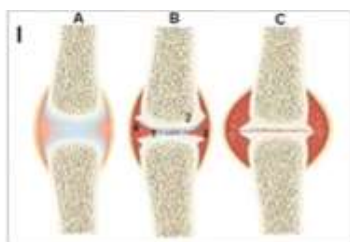


A susceptibilidade dos colágenos do tipo II, IX e XI à ação das metaloproteinases não é homogênea. Estudos imunohistoquímicos confirmam o aumento de neo-epítomos na cartilagem artrósica, que correspondem a peptídeos decorrentes da degradação do colágeno tipo II, pelas MMP-1 (colagenase-10, MMP-8 (colagenase-2) e MMP-13 (colagenase-3)<sup>12</sup>.

A articulação osteoartrósica pode também promover liberação de mediadores pró-inflamatórios, sintetizados pelos condrócitos e pelas células inflamatórias presentes na membrana sinovial, tais como a interleucina (IL) 1, a mais importante citocina -pró-catabolismo, além do TNF $\alpha$  (fator e necrose tumoral alfa) e IL-6<sup>13</sup>.

A IL-1 e o TNF $\alpha$  podem contribuir para a destruição da articulação através da indução da liberação de metaloproteinases e ativação de enzimas líticas, via elevação do plasminogênio e seus ativadores, além da diminuição de produção de TIMP e dos inibidores do plasminogênio<sup>14</sup>.

Além das metaloproteinases e citocinas responsáveis pela degradação da cartilagem articular na osteoartrose, também tem sido salientada a contribuição do óxido nítrico (NO) na patogenia desta doença. O óxido nítrico é produzido em grandes quantidades por condrócitos ativados por citocinas e exerce vários efeitos catabólicos, como: inibição da síntese de colágeno e proteoglicanos, ativação de metaloproteinases, inativação de TIMP, inibição da proliferação de condrócitos, interferência na sinalização de integrinas e indução de apoptose de condrócitos in vitro<sup>15</sup>.



A = normal

B = estágio com alterações

C = estágio terminal

#### ARTRITE REUMATOIDE<sup>16</sup>

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica autoimune que causa dano articular, perda funcional, dor e fadiga ao paciente. A causa da AR ainda é desconhecida, mas estudos mostraram ser uma doença de origem multifatorial tendo fatores genéticos e epigenéticos na sua gênese. Fatores ambientais



como a fumaça do cigarro, exposição a poeira e a microbiota intestinal também se mostraram muito relevantes na patogênese da AR. A AR é uma artrite simétrica que inicialmente atinge pequenas articulações e posteriormente acomete grandes articulações, podendo também afetar olhos, pele, coração, pulmões e fígado<sup>17,18</sup>.

A doença acarreta grande impacto para qualidade de vida do indivíduo acometido, ocasionando limitações nas atividades sociais, de lazer e profissionais, bem como para a sociedade como um todo, em função de seu considerável ônus sócio-econômico.

Estima-se que até 5% das pessoas possam apresentar a doença, sendo que sua frequência média é de 0,5 a 1% da população mundial. Todas as faixas etárias podem ser acometidas, mas a doença é mais prevalente nos pacientes entre a 4ª e 6ª décadas de vida, com nítido predomínio no sexo feminino (2,5 a 3 vezes em relação ao sexo masculino).

Houve, nos últimos anos, notável evolução nos conhecimentos da fisiopatogenia da doença, o que acarretou mudanças na forma de abordagem e na terapêutica da artrite reumatoide, com a utilização de novas classes de drogas. Apesar disso, o fator limitante à boa resposta terapêutica continua sendo o retardo no diagnóstico e na instituição do tratamento adequado.

Diversos fatores parecem estar envolvidos no desencadeamento e perpetuação do processo inflamatório crônico, incluindo características genéticas, fatores ambientais, estímulos antigênicos infecciosos e alterações imunológicas.

#### Fatores Imunológicos

A reação inflamatória contra a sinóvia seria desencadeada pela apresentação de um antígeno a um linfócito sinovial e possivelmente mantida pela presença do próprio antígeno desencadeante e da produção de mediadores, como interleucinas ou citocinas.

Os linfócitos T CD4 positivos (predominantes na membrana sinovial) são capazes de produzir citocinas, atraindo e ativando macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, produzem citocinas implicadas no desenvolvimento da artrite reumatoide e na manutenção do processo inflamatório como interleucina (IL) 1 e fator de necrose tumoral (TNF). Além destas, outras citocinas, como fatores de crescimento, produzidas pelos macrófagos, sinoviócitos, fibroblastos e células endoteliais, mantêm o processo inflamatório.

A produção de anticorpos é também um elemento da patogênese da artrite reumatoide, havendo formação de complexos antígeno-anticorpo e ativação do sistema do complemento. O exemplo clássico é o chamado fator reumatoide (FR), que é um anticorpo dirigido contra o fragmento Fc da imunoglobulina. O FR, embora não de maneira obrigatória nem específica, frequentemente está presente nos pacientes





com AR. A formação de imunocomplexos entre o FR e imunoglobulinas, com desencadeamento da cascata de ativação do complemento e de mecanismos de fagocitose, é importante tanto para a ocorrência da inflamação articular quanto dos processos extra-articulares.

Outros fatores estudados incluem a participação dos linfócitos B na patogênese da artrite reumatoide, as alterações endoteliais e a deficiência de inibidores (como o inibidor de IL-1, de IL-2 e de TNF) associada à superprodução de citocinas.

### Características Patológicas

Em resposta à inflamação tissular, a membrana sinovial sofre modificações, com hipertrofia e hiperplasia das células sinoviais e extensa neoangiogênese. As células endoteliais são ativadas para expressar moléculas de adesão. As citocinas e fatores de crescimento produzidos durante o processo inflamatório, como o fator derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF-beta) facilitam o influxo de células inflamatórias adicionais.

Forma-se um infiltrado linfocitário proeminente, podendo estabelecer-se verdadeiros folículos linfoides, ricos em linfócitos T e plasmócitos.

Surge assim, a partir da membrana sinovial, o *pannus* – tecido granulomatoso com características tumorais, capaz de invadir e destruir os tecidos cartilaginoso e ósseo e responsável pela extensa destruição articular frequentemente observada na artrite reumatoide. As propriedades destrutivas do *pannus* são relacionadas à produção de metaloproteinases de matriz (MMP) e outras enzimas que são capazes de degradar colágeno e proteoglicanos.

Os neutrófilos mostram tendência à compartimentalização na artrite reumatoide, constituindo a maior parte do componente celular do líquido sinovial. Os neutrófilos são atraídos para o líquido sinovial por citocinas produzidas pelo tecido sinovial, sendo as mais importantes o fator de crescimento (TGF) beta e a IL-8, além dos clássicos fator C5a do complemento e leucotrieno B4. Como resultado, observa-se acúmulo de proteinases ativadas e metabólitos do oxigênio que contribuem para o processo.

### Manifestações Articulares

As manifestações articulares da artrite reumatoide podem ser divididas em:

- Manifestações reversíveis: relacionadas à sinovite inflamatória em sua fase inicial;
- Danos estruturais irreversíveis: deformidades causadas pela sinovite persistente, destruição óssea e cartilaginosa, imobilização e alterações musculares, tendíneas e ligamentares.



## Sinovite

A característica básica da manifestação articular da artrite reumatoide é a inflamação da sinóvia (sinovite), podendo acometer qualquer uma das articulações diartrodiais do corpo.

A queixa clínica é de dor, edema e limitação dos movimentos das articulações acometidas. Ao exame físico, observa-se presença de dor e edema das articulações e, eventualmente, sinais de derrame intra-articular. Articulações profundas, como quadris e ombros, podem não mostrar sinais evidentes de inflamação ao exame.

São características da Artrite Reumatoide:

- Acometimento poliarticular: geralmente mais de 4 articulações estão envolvidas. No entanto, a doença pode ser oligo ou até monoarticular;
- Artrite em mãos: o acometimento de punhos, metacarpofalângicas (MCF) e interfalângicas proximais (IFP) são frequentes, desde o início do quadro. O acometimento das interfalângicas distais (IFD) é raro, o que é útil para diferenciar a AR de outras condições, como a osteoartrose e a artrite psoriásica;
- Artrite simétrica: acometimento simétrico das articulações dos dois lados do corpo é a regra, embora nos casos das MCF e metatarsofalângicas (MTF), a simetria não necessite ser completa;
- Artrite cumulativa ou aditiva: a sinovite costuma ter padrão cumulativo (acometer progressivamente novas articulações, sem deixar de inflamar as anteriormente afetadas);
- Rigidez matinal: a rigidez matinal prolongada, caracterizada por enrijecimento e sensação de edema, percebida sobretudo pela manhã, é um aspecto quase universal da inflamação sinovial. Diferente da breve rigidez observada na osteoartrite (5 a 10 minutos), a rigidez dura mais de 1 hora. Este fenômeno relaciona-se à imobilização que ocorre durante o sono ou repouso e não à hora do dia. A duração tende a se correlacionar com o grau da inflamação, sendo um parâmetro que deve ser documentado para acompanhar a evolução da doença.

## TRATAMENTO

As estratégias terapêuticas atualmente empregadas no manejo da osteoartrite e da artrite reumatoide são multidisciplinares e incluem: medidas gerais, como educação do paciente e de seus familiares, terapia medicamentosa, terapia física e reabilitação, terapia ocupacional e cirurgias (quando necessárias). O reconhecimento da importância do diagnóstico e tratamento precoce das artrites podem evitar ou retardar a progressão da doença<sup>19</sup>.





O tratamento medicamentoso inclui obter o controle da dor e da inflamação e limitar o dano articular, melhorando o prognóstico funcional a longo prazo. A terapia com aplicações intra-articulares de ácido hialurônico (AH) vem demonstrando efeito benéfico no controle dos sintomas da OA do joelho. Os condroprotetores (associação de condroitina e glucosamina, parecem retardar a progressão da osteoartrite.

O exercício físico deve ser um ponto importante na abordagem não farmacológica da dor osteoarticular, dependendo da idade, da existência de fatores de comorbidade, de dor severa e incapacidade funcional diagnosticadas. A perda de peso deve ser igualmente considerada em doentes com obesidade ou sobrepeso<sup>20</sup>.

Tendo em vista a etiologia, a fisiopatologia e os efeitos colaterais das terapias medicamentosas e a ausência de um medicamento ou terapia única eficaz na proteção e tratamento do desgaste articular, um suplemento nutricional denominado colágeno tipo II nativo (não desnaturado) vem sendo estudado por vários pesquisadores com o objetivo de elucidar sua capacidade de promover flexibilidade, mobilidade e suporte para as articulações, com eficiência na redução da degradação do colágeno articular. A diminuição da lesão articular é decorrente de redução da resposta imune secundária ao processo inflamatório que a cartilagem com osteoartrite está sendo submetida<sup>21</sup>.

A compreensão atual do papel de várias citocinas na fisiologia articular normal e o crescente conjunto de evidências sugere que a biologia dos condrócitos normais é regulada pelos mesmos mecanismos T reguladores e citocinas imunes responsáveis pelo tratamento e prevenção do processo inflamatório em indivíduos não saudáveis. A suplementação de colágeno tipo II não hidrolisado, pode modular a função articular sendo benéfica para aliviar o desconforto articular advindo da prática de atividades físicas e restaurar a função articular também em indivíduos saudáveis<sup>22</sup>.

Em estudos sobre sintomas articulares como os provenientes da AO e AR, suplementos alimentares são comumente usados por pacientes buscando aliviar a dor e melhorar a condição física<sup>23,24</sup>.

Um desses suplementos é o colágeno tipo II não desnaturado, considerado como um dos novos nutracêuticos, associado a uma possível melhora dos sintomas com redução de efeitos colaterais se comparado com outras soluções mais populares, como anti-inflamatórios sintéticos. Esses fármacos possuem resultados insatisfatórios nos tratamentos por conta da necessidade de uso contínuo e efeitos colaterais consequentes desse uso. Como resultado disso abre espaço para tratamentos alternativos, como o uso de colágeno tipo II não desnaturado, por exemplo, que procuram tratar os sintomas de forma mais saudável, reduzindo seus efeitos colaterais<sup>25</sup>.



## MECANISMO DE AÇÃO

Proknee® 40 Collagen II atua por mecanismo de tolerância oral, onde sua suplementação em baixas doses, demonstra a habilidade de suprimir a ativação de células T, responsáveis por respostas imunitárias celulares e/ou humorais a um antígeno, por administração prévia do mesmo por via oral.

A ingestão de colágeno tipo II de forma repetida cria interações antigênicas com as células dendríticas e com as células T reguladoras residentes dentro do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que reveste o trato gastrointestinal. As células T reguladoras secretam citocinas imunomoduladoras, como a interleucina-10 (IL-10) e o fator transformador do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), as quais inibem a resposta imune ao colágeno tipo II (antígeno), que, por sua vez, pode reduzir a resposta imune ao colágeno tipo II exposto dentro da matriz extracelular da cartilagem articular e, conseqüentemente, impedir a reação inflamatória excessiva<sup>26</sup>.

Até onde sabemos, a osteoartrite não tem característica auto-imune, mas compartilha com a artrite reumatoide da degradação da cartilagem e da conseqüente resposta inflamatória. O papel da tolerância oral no manejo da osteoartrite continua a ser investigada. No entanto, pesquisas futuras focadas no estudo farmacodinâmico dos efeitos terapêuticos do colágeno podem oferecer novos insights na fisiopatologia da osteoartrite.<sup>44</sup>

## TOLERÂNCIA ORAL

A tolerância oral é um processo imunológico que o organismo utiliza para distinguir entre compostos inócuos e invasores potencialmente prejudiciais. Ocorre no tecido linfóide associado ao intestino: G.A.L.T (*gut-associated lymphoid tissue*) que consiste de folículos linfóides distribuídos ao longo do trato gastrointestinal. Esse tecido linfóide associado ao intestino representa um dos maiores órgãos linfóides do corpo, pois contém quase 70% das células imunes<sup>27</sup>.

Geralmente, no tecido linfático associado ao intestino, esses folículos são isolados um do outro, mas os folículos presentes no íleo (a última porção do intestino delgado) são agrupados para formar as placas de Peyer.

A principal função das placas de Peyer como parte do sistema imunológico das mucosas intestinais é proteger o intestino da invasão por microorganismos potencialmente patogênicos.

As placas de Peyer participam da “absorção” de células estranhas ou patogênicas, no entanto, foi demonstrado que as células pertencentes a essa região também são capazes de distinguir entre certos antígenos e entre bactérias não patogênicas associadas ao trato intestinal.



Esse processo de reconhecimento dos não-patogênicos é conhecido como “tolerância oral” e é um processo ativo que leva à formação de linfócitos T específicos, capazes de impedir o desencadeamento de uma resposta imune desnecessária. A tolerância oral também é definida como a eliminação específica do antígeno das respostas imunes humorais e celulares aos antígenos que atingem o corpo pela via oral, sendo especialmente útil para a proteção da mucosa intestinal contra respostas imunes inflamatórias desfavoráveis.

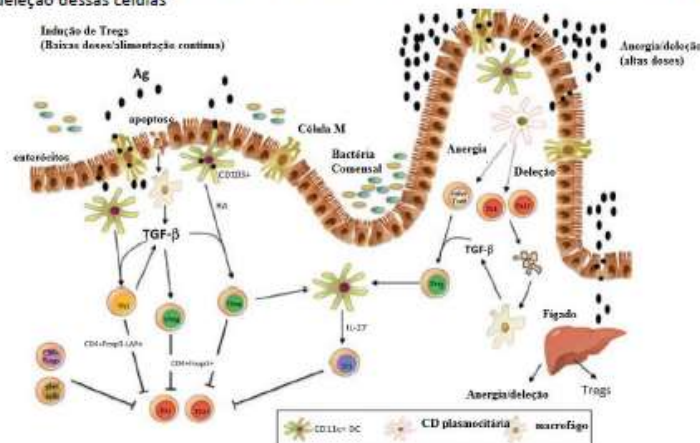
Diferentes mecanismos têm sido implicados na tolerância oral, incluindo ativação das células Tregs, bem como deleção clonal e anergia das células T. Inúmeros estudos sugerem que estes mecanismos são determinados pela dose dos antígenos administrados, com altas doses favorecendo a deleção clonal ou anergia, enquanto que baixas doses estão relacionadas à supressão pelas células<sup>28,29,30</sup>.

Quando ministrados em baixas doses, os antígenos estimulam o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e geram preferencialmente resposta imune do tipo Th2<sup>29</sup>. As células regulatórias geradas por esse fenômeno (supressão) agem pela secreção de citocinas supressoras como TGF- $\beta$ , interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10). Essas células regulatórias específicas ao antígeno migram para órgãos linfóides e podem inibir a geração de células efetoras (TH1), liberando no órgão alvo citocinas capazes de suprimir a doença<sup>30</sup>.

Os mecanismos que postulam que as células Treg podem inibir uma típica resposta Th1 relatam que neste tipo de resposta, uma APC apresenta o antígeno às células T e secreta a citocina IL-12, que por sua vez, estimula a diferenciação das células T em Th1 efetoras. As células Th1 produzem IFN- $\gamma$ , que ativa os macrófagos na fase efetora da resposta. Células T reguladoras podem inibir a ativação de células T por mecanismos ainda não definidos, que dependem de contato entre as células regulatórias e as APCs ou as células ativadas. Algumas células Treg podem secretar citocinas imunossupressoras, como IL-10 (que inibe a função das APCs e a ativação dos macrófagos) e TGF- $\beta$  (que inibe a proliferação das células T e também a ativação dos macrófagos<sup>27</sup>).



**Figura 1- Mecanismos de Indução de Tolerância Oral.** Em baixas doses, as CDs processam os antígenos e passam a liberar citocinas antiinflamatórias, como TGF- $\beta$  e ácido retinóico, que estimulam as Tregs, que por sua vez inibem a resposta inflamatória de outras células T. Em altas doses, as CDs processam os antígenos que entram em contato com as células T efetoras, estimulando a anergia ou a deleção dessas células.



Fonte: Adaptada de Weiner e colaboradores, 2011.

## TESTES

O colágeno tipo II vem sendo objeto de vários estudos científicos ao longo das últimas décadas. Tais estudos demonstram um perfil de segurança e de eficácia favorável ao uso desta substância bioativa como opção na prevenção e tratamento de distúrbios articulares.

Proknee Collagen U11® possui em sua composição um teor mínimo de 3% de colágeno tipo II não desnaturado, como pode ser observado na sua especificação, caracterizado por um método de ensaio por imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), que utiliza um anticorpo monoclonal específico para epítomos expressos apenas por proteína de colágeno tipo II não desnaturada. Desta forma, os resultados obtidos pelo ensaio Elisa confirmam que o processo utilizado para a obtenção de Proknee Collagen U11® mantém a estrutura não desnaturada do colágeno tipo II, essencial para o mecanismo de ação e benefícios de uso deste ingrediente na saúde das articulações.

Relacionamos abaixo alguns artigos que ilustram as publicações que referendam o uso de colágeno tipo II não desnaturado:

Entre em contato



## 1. Estudos Toxicológicos

Derivados de colágeno são bem tolerados sem grandes preocupações de segurança<sup>31</sup>. Marone e colegas (2010) avaliaram a segurança de amplo espectro do colágeno tipo II não desnaturado derivado de cartilagem do esterno da galinha, por uma variedade de ensaios toxicológicos, incluindo estudos de **genotoxicidade, como o ensaio de mutação reversa bacteriana de Ames e os testes de “linfoma de ratinho”**; bem como um estudo de toxicidade subcrônica de 90 dias, dependente da dose; além de irritação dérmica aguda, dérmica aguda, primária e toxicidade primária por irritação ocular. O estudo demonstrou a segurança de largo espectro do colágeno tipo II em animais em relação aos níveis de dose e vias de administração testadas. Esses resultados, combinados com os dados em animais<sup>32,33,34,35,36</sup> e em humanos<sup>32,37</sup>, demonstram a segurança de amplo espectro do colágeno tipo II.

1.1 Teste de mutação reversa em *Salmonella typhimurium*: conduzido para determinar a habilidade do colágeno tipo II derivado da cartilagem de esterno de frango de induzir mutação reversa.

O colágeno tipo II foi avaliado no teste de incorporação da placa Ames/Salmonella para determinar seu potencial de induzir mutação reversa em *loci* de histidina selecionada em cinco cepas de teste de *Salmonella typhimurium* viz. TA 1535, TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 102 na presença e ausência de sistema de ativação metabólica (S9). Suspensões das células bacterianas foram expostas ao colágeno tipo II em culturas triplicatas em concentrações de 10.1, 31.6, 100, 316, 1000, 2500 e 5000 mcg/placa na presença e ausência de sistema de ativação metabólica exógena (S9). As suspensões foram misturadas com ágar em sobreposição e emplacadas imediatamente com meio mínimo. Após 48 h de incubação, as colônias com mutação foram contadas e comparadas com o número de colônias com mutação espontânea nas placas de controle de veículo (negativo)<sup>32</sup>.

Resultados: Não foram observados efeitos tóxicos do colágeno tipo II derivado da cartilagem do esterno de frango em nenhuma das cinco cepas utilizadas no grupo de maior dose avaliado (com e sem ativação metabólica). Não foram observados aumentos biologicamente relevantes dos números de colônias com mutação em nenhuma das cepas seguido do tratamento com o colágeno tipo II em nenhum dos níveis de concentração, na presença ou ausência de ativação metabólica. Portanto, o colágeno tipo II derivado da cartilagem do esterno de frango não causa mutações de genes por mudanças de pares de base ou no quadro de leitura no genoma das cepas de teste utilizadas, indicando que o colágeno tipo II não é mutagênico<sup>32</sup>.

1.2 Teste de mutação em célula mamária *in vitro* em linha celular linfoma L5178Y de ratos

O teste foi realizado na presença e ausência de sistema de ativação metabólica exógena no *locus* do gene que codifica a enzima *thymidine kinase* nas células de linfoma de rato. O colágeno tipo II foi investigado nas seguintes concentrações: experimento I com e sem ativação metabólica, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500 e 2000 mcg/ml; experimento II com ativação metabólica, 300, 500, 700, 1100, 1400, 1800 e 2000 mcg/ml; e experimento II sem ativação, 4.4, 17.6, 39.6, 70.4, 110, 264, 330 e 440 mcg/ml<sup>32</sup>.





Resultados: Não foram encontrados aumentos biologicamente relevantes de mutações após o tratamento com colágeno tipo II (com ou sem ativação metabólica). Não foi observada relação de dose-resposta. Adicionalmente, nos experimentos I e II o tamanho das colônias não demonstrou efeitos clastogênicos induzidos por colágeno tipo II. Portanto, sob as condições experimentais do estudo, não foram encontradas evidências de atividade mutagênica para o colágeno tipo II na linha celular de linfoma de rato L5178Y, e o colágeno tipo II não tem potencial para induzir mutagenicidade nesse teste<sup>32</sup>.

### 1.3. Toxicidade oral aguda

A avaliação da toxicidade oral aguda foi conduzida em ratos para determinar o potencial do colágeno tipo II de produzir toxicidade aguda oral a partir de uma única dose via oral. Foram utilizados seis ratos Sprague Dawley jovens, saudáveis, fêmeas albinas, não grávidas e nulíparas (com idades entre 9 e 10 semanas, peso inicial entre 188 e 197 g). Foram selecionadas fêmeas para o teste, pois são frequente-mente mais sensíveis à toxicidade dos compostos testados do que os machos<sup>32</sup>.

Os ratos tinham acesso livre à alimentação padrão, água filtrada e foram mantidos a temperatura controlada (20 – 24°C) e ciclo de luz (12h claro/12h escuro). Foram mantidos nas condições descritas por pelo menos 10-14 dias antes do início do fornecimento da dose.

Antes de cada dose, os animais ficaram em jejum durante a noite, e as doses individuais foram calculadas baseadas nos pesos corpóreos iniciais na proporção de 5000 mg/kg. O colágeno tipo II foi administrado em suspensão de 14% em água destilada<sup>32</sup>.

Resultados: O colágeno tipo II derivado da cartilagem do esterno de frango administrado na dose de 5.000 mg/kg de peso corporal não causou mortalidade e não foram demonstrados sinais de toxicidade imediata, efeitos farmacológicos adversos, ou comportamentos anormais nos ratos fêmeas após a dose e durante o período de observação de 14 dias. Todos os animais sobreviveram, tiveram aumento de peso normal e aparentaram atividade e saúde durante o estudo. Nenhuma anormalidade abrupta ou alterações patológicas foram verificadas durante a necropsia. Baseado nesses resultados e sob as condições do estudo, a dose oral aguda LD50 de colágeno tipo II pode ser ainda maior que 5.000 mg/kg de peso corporal em ratos fêmeas<sup>32</sup>.

### 1.4. Toxicidade subcrônica

Marone e colegas (2010) realizaram também estudo de toxicidade oral de 90 dias conduzido em ratos machos e fêmeas para determinar o potencial do colágeno tipo II derivado da cartilagem do esterno de frango a produzir toxicidade. O *no observed adverse effect level* (NOAEL) foi procurado para cada sexo. Oitenta ratos saudáveis (40 machos e 40 fêmeas) foram selecionados para o teste e igualmente distribuídos em quatro grupos (10 machos e 10 fêmeas por dose). Os animais pesavam na faixa de 195 – 219g (machos)





e 148 – 174 g (fêmeas) e tinham entre 7 – 8 semanas de idade no início do estudo. A substância teste foi administrada oralmente em 0,4% (baixa dose), 4,0% (média dose) ou 10% (alta dose). As doses individuais foram calculadas com base no peso corporal semanal mais recente e foram ajustadas a cada semana para manutenção da dose pretendida em todos os ratos. Todas as doses foram administradas volumetricamente após a correção da diluição. As doses foram administradas em todos os grupos em um volume de dose constante de 10,0 ml/kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água destilada) no mesmo volume que os animais testados<sup>32</sup>.

Resultados: Dois animais machos faleceram (um do grupo 3 e um do grupo 4) nos dias 86 e 69, respectivamente. O animal no grupo 3 estava ativo e saudável antes da morte e faleceu imediatamente seguido da avaliação de atividade motora. A causa da morte não foi definitivamente determinada; entretanto, não houve evidência que sugerisse que a mortalidade fosse atribuída à administração da substância teste.

Não foram encontrados sinais clínicos relacionados à substância em nenhum grupo teste que tenha sido considerado de significância toxicológica.

Não houve mudanças nos pesos individuais dos órgãos ou pesos individuais órgãos/cérebro. As razões órgão/peso corporal não foram afetadas, exceto pelas razões rins/peso corporal que diminuíram no grupo 3 de machos. Este achado não foi associado com nenhum outro achado clínico e não anunciou nenhuma mudança patológica correspondente nos animais de alta dose. Portanto, esta alteração foi tida como incidental e sem interesse toxicológico.

A administração oral de colágeno tipo II levou a diminuições de consumo de alimentos dose-relacionadas em machos e fêmeas; entretanto, o peso corporal, ganho de peso corporal e a eficiência alimentar permaneceram em geral sem alterações. Reduções no consumo alimentar foram consideradas relacionadas à substância teste e podem ser de interesse toxicológico na luz dos achados patológicos de eosinofilia nos cornetos nasais na alta dose.

Em geral, os resultados de comportamento funcional nos grupos teste de machos e fêmeas foram considerados comparáveis com os dos grupos controle. As diminuições em medidas quantitativas ou aumentos na incidência de medidas de campo aberto foram mínimos e não associados com a constelação de achados que poderia dar suporte a mudanças comportamentais com significância toxicológica.

### 1.5. Toxicidade crônica

Para a avaliação a longo prazo, foram escolhidos como animais para teste os cachorros, uma vez que são monogástricos e possuem uma única câmara estomacal, similar aos humanos. Estudos de segurança de longo termo em cachorros foram conduzidos em vinte cães de raça (idades entre 7 e 12 anos) durante um período de 150 dias. Cachorros foram aleatoriamente designados a pertencer ao grupo placebo ou grupo tratado com colágeno solúvel (colágeno tipo II solúvel não desnaturado, proveniente de cartilagem do



esterno de frangos). A dose diária administrada foi de 40 mg. Os parâmetros de segurança foram avaliados a partir de amostras sanguíneas colhidas nos dias 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias para avaliar alanina aminotransferase (ALT), nitrogênio ureico sanguíneo (BUN) e creatina quinase (CK). Peso corporal, ritmos cardíaco e respiratório também foram avaliados em ambos os grupos nos mesmos dias.

Resultados: O colágeno tipo II solúvel foi bem tolerado e não houve eventos adversos relatados em nenhum dos animais. Ao contrário, a atividade dos cachorros no grupo de tratamento melhorou significativamente. Não houve diferenças significantes nos parâmetros avaliados dos dois grupos ou entre os grupos tratados.

Estudos de segurança de longo prazo (período de 150 dias) em cachorros não demonstraram eventos adversos ou alterações significativas na química sanguínea, peso corporal e ritmos cardíaco e respiratório, demonstrando que o colágeno tipo II é seguro para consumo<sup>38</sup>.

## 2. Estudos Clínicos

### Estudos em humanos

#### 2.1 Estudo 1<sup>39</sup>

Objetivo: avaliar a eficácia do colágeno tipo II (CCII) em comparação a metotrexato na artrite reumatoide. 236 pacientes | artrite reumatoide | 24 semanas | 0,1 mg/dia e 10mg MTX/sem | multicêntrico duplo cego controlado

Resultados:

Índice	Colágeno tipo II	Metotrexato
ACR20	68,57%	83,02%
ACR50	40,95%	57,54%

Conclusão: As taxas de resposta no grupo colágeno tipo II (CCII) foram mais baixas do que as do grupo MTX. Os resultados foram estatisticamente diferentes entre os 2 grupos tratados ( $p < 0,05$ ).

Em ambos os grupos houve uma diminuição da dor, rigidez matinal, contagem de articulações edemaciadas, contagem de articulações dolorosas, pontuação OAS (Questionário de Avaliação de Saúde) e VAS (avaliação subjetiva da dor), atividade global da doença observada pelo paciente e atividade global da doença observada pelo médico.



## Observações

Ambos os tratamentos foram bem tolerados em todos os pacientes.

Houve efeitos secundários menores e mais brandos no grupo CCII do que no grupo MTX. A incidência de acontecimentos adversos entre a CCII e o grupo MTX foi estatisticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

• **Score do American College of Rheumatology (ACR): leva em conta o número de articulações inflamadas, o número de articulações dolorosas e mais pelo menos 3 dos seguintes:** - atividade global da doença observada pelo paciente - atividade global da doença observada pelo médico - avaliação subjetiva da dor - medida de comprometimento funcional (QAS, por exemplo) - reagentes de fase aguda (proteína C reativa ou velocidade de sedimentação globular)

## 2.2 Estudo 2<sup>40</sup>

Objetivo: avaliar a eficácia e segurança do CCII no tratamento da artrite reumatoide (RA).

503 pacientes | 18 a 65 anos | artrite reumatoide | 24 semanas | 0.1 mg /dia CCII (n = 326) e 10 mg/sem MTX (n = 177) | multicêntrico duplo cego placebo controlado randomizado | fase III

Resultados:

Índice	Colágeno tipo II	Metotrexato
ACR20	41,55%	57,86%
ACR50	16,89%	30,82%

Conclusão: o estudo fornece provas da potencial eficácia e segurança do colágeno tipo II (CCII) em pacientes com AR.

Os voluntários não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados, antes dos tratamentos. Em ambos os grupos, houve reduções da dor, rigidez matinal, contagem de articulações edemaciadas, contagem de articulações dolorosas, pontuação QAS e avaliação de eficácia realizadas tanto pelos investigadores quanto pelos pacientes.

As diferenças dentro do grupo (em 12 semanas) foram estatisticamente significativas para rigidez matinal, contagem de articulações dolorosas, contagem de articulações edemaciadas, atividade global da doença observada pelo paciente e atividade global da doença observada pelo médico.



Entre os grupos CCII e MTX: houve diferenças significativas entre os dois grupos na dor, HAQ e avaliação da eficácia pelos pacientes em 24 semanas.

No grupo MTX: TSE (taxa de sedimentação de eritrócitos) e PCR (proteína C reativa) reduziram em 12 e 24 semanas porém no grupo CCII não foi significativa e houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. O fator reumatoide não foi significativamente afetado por nenhum dos tratamentos.

Ao comparar os resultados do MTX com o CCII, o estudo mostra que o MTX apresentou resultados superiores aos apresentados pelo CCII. No entanto os pacientes tratados com CCII, também apresentaram melhoras significativas na maioria dos parâmetros avaliados, o que mostra a eficácia do tratamento. A vantagem do CCII em relação ao MTX, foi o menor número de efeitos adversos.

Observações: Neste estudo de fase 3, tanto o colágeno tipo II, 0,1mg/dia quanto o MTX 10mg/semana aliviaram efetivamente os sinais e sintomas da artrite reumatoide. No entanto, a eficácia do CCII não excedeu a do MTX.

A incidência dos efeitos adversos foi significativamente diferente entre os grupos de colágeno tipo II e metotrexato. De acordo com estudo anterior o colágeno tipo II levou a menos efeitos adversos em pacientes com artrite reumatoide<sup>39</sup>.

Acima de tudo, o tratamento de doenças auto-imunes por indução da tolerância oral é atrativa devido aos poucos efeitos secundários e fácil implementação clínica desta abordagem. O estudo confirma que o que o tratamento com CII oral leva a melhorias na artrite reumatoide e não causa efeitos secundários significativos. Estes resultados são encorajadores e implicam que a AR pode ser tratada eficazmente com CII oral e, em parte apoiada pelo mecanismo de tolerância oral. Contudo, para esclarecer melhor o papel potencial e eficácia do CCII como um tolerógeno na AR, estudos em curso e trabalhos futuros devem clarificar a resposta autoimune ao colágeno na patogênese da AR, além do que, observações a longo prazo e em grande número de pacientes precisam ser realizadas para confirmar a eficácia e determinar as doses ótimas de colágeno tipo II administrado oralmente e quais os pacientes com doenças auto-imunes poderão se beneficiar mais com este tratamento.

### 2.3 Estudo 3<sup>41</sup>

Objetivo: avaliar a eficácia e tolerabilidade de colágeno tipo II não desnaturado (fabricado usando um processo de baixa temperatura para preservar sua estrutura nativa) na moderação da função articular e dor nas articulações devido ao exercício extenuante em indivíduos saudáveis – sem histórico de doença articular prévia ou dor no joelho em repouso - que relataram desconforto no joelho após esforço físico extenuante.



55 vol (+46 vol) | idade média 46 anos | vol. saudáveis com dor nas articulações pós-exercício | placebo (n = 28) ou colágeno tipo II não desnaturado 40 mg ao dia (n = 27) | randomizado, duplo-cego, controlado por placebo

O desfecho primário avaliado foi a medida de flexibilidade utilizando goniometria de amplitude de movimento (ROM-range of movement), utilizando teste de *stepmill* padronizado desenvolvido e validado por Medicus Research. A função das articulações foi avaliada por alterações no grau de flexão e extensão do joelho e medição do tempo de experimentação e recuperação da dor articular após esforço extenuante no *stepmill*. A extensão do joelho foi medida por goniometria.

O estudo incluiu os seguintes desfechos secundários: avaliação subjetiva da dor e movimento dos joelhos e habilidade para realizar tarefas diárias (KOOS knee survey e Stanford exercise scales), medida da distância percorrida em 6 minutos (RoadRunner Wheel, Keson Industries, Aurora, IL).

Resultados: No 120º dia do estudo foi observada melhora estatisticamente significativa no grupo de indivíduos suplementados com colágeno tipo II não desnaturado, em relação ao placebo (p = 0,011) e à condição basal (p = 0,002), para o desfecho relacionado à habilidade de extensão do joelho.

Aumento significativo na extensão do joelho no grupo intervenção foi observado no 90º dia, mas apenas em relação à condição basal (p = 0,045).

Não foram observadas alterações significativas no grupo placebo em qualquer momento do estudo. Em relação à habilidade de flexão dos joelhos, alterações significativas não foram encontradas para nenhum dos grupos. Sobre o tempo de início da dor no joelho, aumentos estatisticamente significativos foram observados no 90º dia (p = 0,041) e no 120º dia (p = 0,019), mas apenas quando comparado com a condição basal.

Não foram observadas diferenças significativas no grupo placebo ou entre os grupos. Não foram observadas diferenças significativas para os seguintes desfechos: tempo de início da dor máxima no joelho, tempo de melhora inicial na dor articular do joelho, distância percorrida em 6 minutos e número diário de passos, avaliação subjetiva da dor, movimento dos joelhos e habilidade para realizar tarefas diárias. Em relação ao tempo para recuperação completa da dor articular do joelho, também não foram observadas diferenças entre os grupos. No entanto, análise binomial realizada para cada visita realizada demonstrou significância estatística para o grupo intervenção no 120º dia (p = 0,031).

#### Observações

Foram registrados oito eventos adversos, distribuídos igualmente entre os grupos. Nenhum foi associado à suplementação com colágeno II. Nenhum evento adverso grave foi reportado.



Os autores apresentaram duas limitações para o estudo: o tempo para início da dor ter sido limitado a um intervalo de dez minutos e os indivíduos poderem apresentar sinais iniciais de artrite que não atendiam os critérios do ACR (American College of Rheumatology). Com relação à primeira limitação, foi ressaltado que o estudo não abordou a possibilidade de os indivíduos poderem deixar de sentir dor no *stepmill*. Mencionam que estudos futuros devem permitir uma extensão maior do intervalo a fim de avaliar por quanto tempo um indivíduo pode se exercitar antes de relatar dor. Ainda, parâmetros mais bem definidos podem ser utilizados para avaliar até que grau a suplementação com colágeno tipo II não desnaturado, resultaria em finalização da dor no joelho após exercício extenuante em indivíduos saudáveis. Sobre a segunda limitação, argumentam que essa possibilidade foi abordada por meio da realização de exame médico extenso para sinais e sintomas de osteoartrite e por meio da exclusão de voluntários que relataram níveis de dor maiores ou iguais a 5 no primeiro minuto de uso do *stepmill*. Os autores discutem que, uma vez que no estudo foram incluídos indivíduos saudáveis e foi utilizado, como medida de eficácia, desfechos não relacionados a doenças, os benefícios do uso de colágeno tipo II não desnaturado, podem ser extrapolados para indivíduos saudáveis.

Conclusão: a suplementação diária com 40 mg de colágeno tipo II não desnaturado auxilia a função e a flexibilidade das articulações em indivíduos saudáveis, como demonstrado pela extensão do joelho e a substância teria também o potencial de aliviar a dor no joelho.

#### 2.4 Estudo 4<sup>42</sup>

Objetivo: avaliar a eficácia e a tolerabilidade de colágeno tipo II não desnaturado, para a dor da osteoartrite do joelho (OA) e sintomas associados em comparação ao placebo e ao cloridrato de glucosamina mais sulfato de condroitina.

191 vol. | Idade média 53 anos | AO moderada a grave | 180 dias | 3 grupos | 40mg de colágeno II ou 1500 mg clor. glucosamina + 1200mg sulfato de condroitina | multicêntrico randomizado duplo cego controlado por placebo

#### Resultados

Índice	Colágeno tipo II versus placebo	Colágeno tipo II versus GC
WOMAC	p = 0,002	p = 0,04
Sub-escalas WOMAC		
Dor	p = 0,0003	p = 0,016
Rigidez	p = 0,004	p = 0,044
Função física	p = 0,007	-

$p \leq 0,05$  = estatisticamente significativo





WOMAC: questionário de qualidade de vida tridimensional (dor, rigidez articular e atividade física), específico para a avaliação de pacientes com osteoartrite.

O colágeno tipo II não desnaturado apresenta benefícios clínicos em pacientes com OA de joelho, por promover melhora da dor e da função física.

#### Observações

O COMP é um biomarcador de turnover da cartilagem, liberado no soro por condrócitos e células sinoviais. Níveis séricos desse biomarcador têm correlação modesta com a severidade da OA, conforme observado em vários estudos.

No grupo de pacientes que receberam suplemento de colágeno tipo II não hidrolisado e que apresentaram níveis séricos de proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP)  $\geq 285\text{ng/mL}$  (mediana) na avaliação basal, foi observada maior redução na pontuação total do WOMAC em comparação aos pacientes nos grupos placebo e de combinação de glucosamina e condroitina, que tiveram níveis basais semelhantes de COMP.

Também foi observado que, dentre os pacientes do grupo colágeno tipo II, a redução na pontuação do WOMAC foi maior em indivíduos com níveis séricos de **COMP  $\geq 285\text{ ng/mL}$**  versus indivíduos com níveis  $< 285\text{ ng/mL}$  (43% versus 36%).

Em outra análise, foi visto que o grupo que recebeu o colágeno tipo II apresentou uma redução significativa na pontuação média da dor pela escala visual analógica (EVA, em mm) no dia 180 versus placebo (22,6 versus 17; IC 95% -9,5 a -1,8;  $p = 0,002$ ) e versus a combinação glucosamina e condroitina (22,6 versus 18,4; IC 95% -8 a -0,4;  $p = 0,025$ ).

Houve redução significativa na pontuação do índice funcional de Lequesne no grupo do colágeno tipo II no dia 180 versus grupo placebo (2,9 versus 2,1; IC 95% -1,4 a -0,2;  $p = 0,009$ ) e versus grupo de combinação de glucosamina e condroitina (2,9 versus 2,2; IC 95% -1,4 a -0,2;  $p = 0,008$ ).

A melhora significativa no índice de Lequesne, no grupo do colágeno tipo II não hidrolisado, foi atribuída à melhora significativa na subescala de atividades diárias desse questionário.

Além disso, menos participantes no grupo do colágeno tipo II necessitaram de terapia de resgate ao longo do estudo em comparação ao grupo placebo. O colágeno tipo II foi bem tolerado, sem diferenças significativas nos aspectos de segurança entre os grupos avaliados.

Não foram relatadas alterações clínicas para nenhum dos resultados hematológicos, bioquímicos ou de sinais vitais, como também não foram observadas alterações significativas nos resultados das análises de urina. Nenhum efeito adverso foi relacionado ao produto durante o estudo.



Conclusão: O suplemento de colágeno tipo II não hidrolisado apresenta benefícios clínicos em pacientes com OA de joelho, por promover melhora da dor e da função física. A estratificação dos pacientes com OA de joelho feita no estudo, com base nos níveis séricos de COMP, parece ter encontrado os pacientes que respondem melhor ao suplemento de colágeno tipo II, com aqueles com elevados níveis séricos desse biomarcador no início do tratamento, apresentando as melhores respostas a esse suplemento.

## 2.5 Estudo 5<sup>43</sup>

Objetivo: avaliar a segurança e a eficácia do colágeno tipo II não desnaturado em comparação à combinação de cloridrato de glucosamina e sulfato de condroitina (GC) no tratamento da OA de joelho.

52 vol. | idade média 59 anos | OA moderada | 90 dias | 40mg de colágeno II ou 1500 mg clor. glucosamina + 1200mg sulfato de condroitina | duplo cego

### Resultados

Índice	Colágeno tipo II versus placebo	Colágeno tipo II versus GC
WOMAC	33%	14%
VAS	40%	15%
LFI	20,10%	5,90%

1. Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC)
2. Escala subjetiva da dor (VAS)
3. Índice funcional de Lequesne (LFI)

### Observações

Um maior percentual de pacientes no grupo de glucosamina e condroitina necessitou de terapia de resgate em comparação como grupo colágeno tipo II.

Os eventos adversos relatados, considerados possivelmente relacionados ao colágeno tipo II, foram constipação e cefaleia; já no grupo de combinação de glucosamina e condroitina, os eventos adversos observados foram inchaço, dor de estômago, rash, retenção hídrica, urticária em face e tórax e cefaleia.

Conclusão: Ao contrário dos resultados com glucosamina e condroitina, os parâmetros funcionais avaliados com a suplementação de colágeno tipo II alcançaram significância estatística ( $p < 0,05$ ).

O colágeno tipo II não desnaturado (40 mg/dia por 90 dias) é bem tolerado e mais eficaz que glucosamina e condroitina, conforme índice WOMAC em pessoas com OA de joelho moderada a grave.



Resultados utilizando esta escala costumam ser utilizados na forma de percentual de melhora em relação a linha de base. Portanto, ACR20 e ACR50, referem-se respectivamente a melhora de 20% e 50 % no escore da ACR.

## 2.6 Estudo 6

Objetivo: avaliar a eficácia de Proknee Collagen UII® na melhora do índice WOMAC total e subescalas, comparativo a placebo e a associação de glucosamina e condroitina.

40mg versus placebo = resultados preliminares - artigo em fase de publicação

Os resultados foram estatisticamente significativos para o índice WOMAC total e para as subescalas de dor, rigidez e função física.

Estes resultados são esperados para Proknee Collagen UII® em função de seu processo de obtenção que mantém os epítomos antigênicos íntegros, necessários para interagir com as placas de Peyer e induzir tolerância oral. A técnica utilizada para a análise é o Linked Immunosorbent Assay Test (ELISA) sanduiche, validada, reconhecida e utilizada na variedade de estudos realizados para o colágeno tipo II não desnaturado que demonstram a eficácia e segurança deste ingrediente ativo.

## Estudos em animais

Objetivo	Protocolo	Resultados principais	Conclusão
Eficácia clínica e segurança de colágeno tipo II não desnaturado em cachorros obesos com artrite	n=15   3 grupos   0mg, 1mg, 10mg   90 dias(+30dias)	Reduções significativas na dor em geral, bem como na dor durante a manipulação de membros e na claudicação após esforço físico. Não foram observados efeitos colaterais sugerindo boa tolerância	Tratamento diário de cães com artrite, utilizando CCII, melhorou os sinais e sintomas da doença. Houve reincidência da dor no período de retirada do tratamento <sup>45</sup>
Avaliação da redução da dor em cavalos com artrite comparativamente a glucosamina e condroitina	7 grupos   artrite moderada a severa (n = 5-7)   Grupo 1 = placebo Grupo 2= 320mg Grupo 3= 480mg Grupo 4= 640mg Grupo 5= glucosamina + condroitina	Grupo placebo= não houve mudanças Grupos 1, 2, 3 e 3 = melhora significativa na dor da artrite	Todos os suplementos foram bem tolerados. O colágeno tipo II demonstrou ser significativamente mais efetivo que glucosamina e condroitina <sup>46</sup>



## INDICAÇÕES

Lesões articulares por exercícios de alto impacto  
Lesões articulares por sobrepeso e/ou obesidade  
Lesões articulares por esforço repetitivo e/ou outras causas  
Osteoartrite  
Artrite reumatoide

## APLICAÇÕES

Redução da dor  
Melhora da mobilidade e da funcionalidade das articulações  
Uso humano e animal

## CONCENTRAÇÃO DE USO

40mg/dia

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva, Tatiane Ferreira da, Penna, Ana Lúcia Barretto : Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. Rev Inst Adolfo Lutz. 2012; 71 (3): 530-539.
2. Velosa, Ana Paula P et al.: Colágeno na cartilagem osteoartrótica. Rev Bras Reumatol. 2003; 43 (3):160-6.
3. Hay ED : Cell biology of extracellular matrix. Harvard Medical School. 1981; 18: 221-49.
4. Van der Kraan et al.: Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: Relevance for articular cartilage tissue engineering. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: Relevance for articular cartilage tissue engineering. 2002; 10 (8): 631-637.
5. Rosso, Edison.: Envelhecimento do sistema osteoarticular. Einstein. 2008; 6 (1): S7-S12.
6. Ding, C., Cicuttini, F., Scott, F. Glisson, M. Jones, G. Sex differences in knee cartilage volume in adults: Role of body and bone size, age and physical activity. Rheumatology. 2003; 42: 1317-1323.



7. Vina, E.R., Kent Kwok, C.: Epidemiology of Osteoarthritis: Literature Update. *Physiology & behavior*. 2018; 30 (2): 160-167.8. Lomonte Andrea B. V.: Benefícios do colágeno não hidrolisado tipo II na saúde articular. Disponível em: <https://cms.achedoc.prod.vitrineache.com.br>. 2022. 1-9.
9. He, Chao-Peng et al.: The role of AGEs in pathogenesis of cartilage destruction in osteoarthritis. *Bone & Joint Research*. 2022; 11 (5): 292-300.
10. Reynolds JJ.: Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis*. 1996 Mar; 2(1):70-6.
11. Pelletier, Jean Pierre P. et al.: Imbalance between the mechanisms of activation and inhibition of metalloproteinases in the early lesions of experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 1990, 33 (10), 1466-1476.
12. Billingham, R. Clark et al.: Enhanced Cleavage of Type II Collagen by Collagenases in Osteoarthritic Articular Cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 1997, 99 (7) 1534-1545.
13. Fuller R. Osteoartrose. 2000 In: Yoshinary NH, Bonfá EDO. ed. *Reumatologia para o clínico*. São Paulo, Roca, 139-148.
14. Arner, Elizabeth C., Kirkland, Joseph J.: Effect of interleukin-1 on the size distribution of cartilage proteoglycans as determined by sedimentation field flow fractionation. *BBA - General Subjects*, 1989, 993 (1), 100-107.
15. Pelletier, Jean Pierre.: Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis and Rheumatism*, 1998, 41 (7), 1275-1286.
16. Mota, Licia Maria Henrique da.: *Artrite reumatoide*, Medicinanet, 2010, 1-13.
17. Bullock, Jacqueline et al.: Rheumatoid arthritis: A brief overview of the treatment. *Medical Principles and Practice*, 2019, 27 (6), 501-507.
18. Scherer, Hans Ulrich et al.: The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 2020, 110 (january), 1-15.
19. Oliveira, Marcello Zaia.: Efeito dos ácidos hialurônicos como condroprotetores em modelo experimental de osteoartrose. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 2014, 49 (1), 62-68.
20. Ferreira P et al.: diagnóstico e abordagem terapêutica da osteoartrite. *Re. Port Farmacoter*, 2012, 4, 15-28.



21. De Conti, Juliano Bortolo et al.: terapêutica da osteoartrite em pequenos animais: métodos farmacológicos, não-farmacológicos e novas medidas terapêuticas. Enciclopédia Biosfera, 2019, outubro, 530-543.
22. Lugo, James P.: Undenatured type II collagen (UC-II®) for joint support: A randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2013, 10 (1), 1-12.
23. Adriaenssens, Karl Alves.: suplementação de colágeno hidrolisado e seu impacto no tratamento de osteoartrite e artrite reumatoide : uma revisão da literatura. 2015, 1-28.
24. Gross, Anita et al.: Complementary and alternative medicine in back pain utilization report. Evid Rep Technol Assess. 2009; Jan (177): 1-2.
25. Barnett, Martha L.: Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen: Results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis and Rheumatism, 1998; 41 (2): 290-297.
26. Park, KS et al.: Type II collagen oral tolerance: mechanism and role in collagen- induced arthritis and rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 2009; 19(6):581-9.
27. Bueno, V et al.: Tolerância oral : uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. Rev Ass Med Brasil. 1999; 45(1): 79-85.
28. Pinto, Meire Aparecida de Carvalho et al.: Mecanismo de indução de tolerância oral no tratamento de doenças autoimunes. Centro Universitário do Sul de Minas, 206-224.
29. Chen, Youhai et al.: Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. 1995; 378(6536): 177-180.
30. Weiner, H et al.: Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994; 91 (14): 6688-6692.
31. Prabhoo R, Billa G.: Undenatured collagen type II for the treatment of osteoarthritis: a review. International Journal of Research in Orthopaedics. 2018; 4 (5): 684-689.
32. Marone PA et al.: Safety and toxicological evaluation of undenatured type II collagen. Toxicology Mechanisms and Methods. 2010; 20 (4): 175-189.
33. Deparle, LA et al.: Efficacy and safety of glycosylated undenatured type-II collagen (UC-II) in therapy of arthritic dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2005; 28 (4): 385-390.





34. D'Altilio, M. et al. Therapeutic efficacy and safety of undenatured type II collagen singly or in combination with glucosamine and chondroitin in arthritic dogs. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2007; 17:189–196.
35. Gupta, R. C.: Therapeutic efficacy of undenatured type-II collagen (UC-II) in comparison to glucosamine and chondroitin in arthritic horses. *J. vet. Pharmacol. Therap* 2009; 32: 577–584
36. Gupta, RC et al.: Comparative therapeutic efficacy and safety of type-II collagen (UC-II), glucosamine and chondroitin in arthritic dogs: pain evaluation by ground force plate. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2011.
37. Crowley, DC et al. Safety and efficacy of undenatured type II collagen in the treatment of osteoarthritis of the knee: A clinical trial. *International Journal of Medical Sciences*. 2009; 6 (6): 312-321.
38. Yoshinari, Orié et al.: An Overview of a Novel, Water-Soluble Undenatured Type II Collagen (NEXT-II). *Journal of the American College of Nutrition*. 2015; 34 (3): 255-262.
39. Wei W et al.: A Randomized, Double-Blind, Multicenter, Controlled Clinical Trial of Chicken Type II Collagen in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2008; 59 (7): 905-910.
40. Wei W et al.: A multicenter, double-blind, randomized, controlled phase III clinical trial of chicken type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2009; 11 (8) R180.
41. Lugo, JP et al.: Undenatured type II collagen (UC-II®) for joint support: A randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2013; 10 (1): 48.
42. Lugo, JP et al.: Efficacy and tolerability of an undenatured type II collagen supplement in modulating knee osteoarthritis symptoms: A multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition Journal*. 2016; 15: 1-14.
43. Cazzola et al.: Oral type II collagen in the treatment of rheumatoid arthritis. A six-month double blind placebo-controlled study. *Clin Exp Rheumatol*. 2000; 18:571-577.
44. Mannelli, et al. Low dose native type II collagen prevents pain in a rat osteoarthritis model. *Musculoskeletal Disorders*. 2013, 14:228.
45. D'Altilio, M.; Peal, A.; Alvey, M.; Simms, C.; Curtsinger, A.; Gupta, R.C.; Canerdy, T.D.; Goad, J.T.; Bagchi, M.; Bagchi, D. therapeutic efficacy and safety of undenatured type II collagen singly or in combination with glucosamine and chondroitin in arthritic dogs. *Toxicol. Mech. Methods* 2007, 17, 189–196.



46. Gupta, R.C.; Canerdy, T.D.; Skaggs, P.; Stocker, A.; Zyrkowski, G.; Burke, R.; Wegford, K.; Goad, J.T.; Rohde, K.; Barnett, D.; et al. Therapeutic efficacy of undenatured type-II collagen (UC-II) in comparison to glucosamine and chondroitin in arthritic horses. J. Vet. Pharmacol. Ther. 2009, 32, 577–584.

Histórico de alteração de documento: 04/10/22– RW – Rev. 00

