

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

**CAIO CAVALCANTE MACHADO**

**Predição de resposta terapêutica ao metotrexato em pacientes com  
artrite reumatoide através da análise da expressão de CD39 em  
células T reguladoras**

**Ribeirão Preto**

**2023**

**CAIO CAVALCANTE MACHADO**

**Predição de resposta terapêutica ao metotrexato em pacientes com  
artrite reumatoide através da análise da expressão de CD39 em  
células T reguladoras**

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –  
Universidade de São Paulo, como requisito  
para defesa do título de Doutor em  
Medicina.

Área de Concentração: Clínica Médica

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Jr**

**Ribeirão Preto**

**2023**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Ficha Catalográfica

Machado, Caio Cavalcante

Predição de resposta terapêutica ao metotrexato em pacientes com artrite reumatoide através da análise da expressão de CD39 em células T reguladoras.

Ribeirão Preto, 2023

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Jr.

Palavras-chave: artrite reumatoide; metotrexato; células T reguladoras; CD39; biomarcador.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Caio Cavalcante Machado

### **Predição de resposta terapêutica ao metotrexato em pacientes com artrite reumatoide através da análise da expressão de CD39 em células T reguladoras**

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

**Área de concentração:** Clínica Médica

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Jr

Instituição: Universidade de São Paulo      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_      Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_      Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_      Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_      Assinatura: \_\_\_\_\_



## DEDICATÓRIA

À Maria Luísa, minha filha, por ser a luz e a alegria dos meus dias. À minha esposa Simony, por seu amor e apoio incondicional. Ao meu pai Pedro, pela fonte de inspiração e exemplo de caráter. À minha mãe Ana, minha fonte de amor e exemplo de bondade. Aos meus irmãos Iago e Iasmin, por nosso companheirismo e amizade inabaláveis. Ao meu tio José Humberto e tia Lúcia, pelos conselhos e suporte emocional desde o início desta jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Paulo Louzada Jr, pela oportunidade de realizar este trabalho, orientação e apoio. Sinto-me imensamente privilegiado por ter sido seu aluno.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, pelo apoio, supervisão e grande incentivo. Sua paixão pela pesquisa me motivou a sempre buscar ir mais além.

Ao Prof. Dr. Raphael Sanches Peres, pela orientação, revisão deste trabalho e por sua grande amizade.

Ao Prof. Dr. Renê Donizeti de Oliveira e Prof. Dr. Sérgio Couto de Almeida pela colaboração no recrutamento e assistência aos pacientes, discussões clínicas e orientação.

À Ayda Henriques Schneider e ao Mikhael Haruo de Lima pela imprescindível contribuição com os experimentos, revisão e discussões científicas.

Aos demais colaboradores deste trabalho: Daniele Carvalho Nascimento, Alexandre Gomes de M. Maganin, Flávio Falcão L. de Souza, Lívia Corrêa Barroso, Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha e Prof. Dr. José Carlos F. Alves-Filho.

Aos Professores Christopher Buckley, Mark Coles, Stephanie Dakin e Stephen Sansom pelo meu período de intenso aprendizado e amadurecimento científico durante o doutorado sanduíche na Universidade de Oxford.

À Livia Maria C. S. Ambrósio, pela amizade, carinho e suporte nos experimentos.

À Marcella Daruge Grando, Juliana Abumansur, Ieda Regina dos Santos, Sérgio Roberto Rosa, Ana Kátia dos Santos e Diva Montanha pela assistência técnica.

À CAPES pela bolsa PrInt USP, à FAPESP e ao CRID pelo apoio financeiro à pesquisa.

Ao Dr. Flávio Petean, Dra. Fabíola Reis, Dr. Rodrigo Oliveira, Dr. Rodrigo Luppino, Dra. Daniela Moraes, Prof. Dra. Maria Carolina e Dra. Lucienir Maria da Silva (também conhecida como Tia Lu) pelos valiosos ensinamentos durante a residência médica em Reumatologia no HCRP.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos pacientes que, apesar das limitações impostas por sua condição clínica, gentilmente aceitaram participar desta pesquisa na esperança de contribuírem para uma melhor assistência aos indivíduos com doenças reumáticas.

## RESUMO

MACHADO, CC. **Predição de resposta terapêutica ao metotrexato em pacientes com artrite reumatoide através da análise da expressão de CD39 em células T reguladoras.** Tese de doutorado – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória que afeta 1% da população mundial e é caracterizada por um infiltrado de células do sistema imune no tecido sinovial. A primeira escolha para o tratamento da AR consiste no uso do metotrexato (MTX) em baixas doses. No entanto, uma parte considerável dos pacientes com AR é refratária a este medicamento (60%) e o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre ainda não foi totalmente estabelecido. O efeito anti-inflamatório do MTX associa-se com sua capacidade de aumentar os níveis extracelulares de adenosina, que por sua vez tem ação imunomoduladora. Neste contexto, um estudo do nosso grupo demonstrou que pacientes com AR não responsivos ao tratamento com MTX apresentam uma menor expressão da ectonucleotidase CD39 em células T reguladoras (Treg) isoladas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e analisadas por citometria de fluxo. Esta ectonucleotidase é uma das principais vias de produção de adenosina extracelular através da metabolização do trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP). Assim, realizamos um estudo prospectivo unicêntrico, com inclusão de 69 pacientes com diagnóstico inicial de AR e virgens de tratamento, submetidos posteriormente ao tratamento com MTX. Corroboramos a correlação da baixa expressão do CD39 nas Treg ao diagnóstico como biomarcador de resposta terapêutica isolados não só a partir do PBMC, como também a partir do sangue total (ST), usando uma técnica mais rápida, simples e barata. Constatamos que os níveis de atividade da doença, idade, sexo, tabagismo, níveis de fator reumatoide e anti-CCP não se correlacionam com diferente expressão do CD39. Buscamos complementar a acurácia na predição de resposta terapêutica por meio da dosagem de 42 citocinas inflamatórias no plasma, identificamos que elevados níveis de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) e interleucina 17 (IL-17) ao diagnóstico da doença estão associados a maior risco de falha ao MTX. Por fim, utilizando um modelo experimental de artrite, demonstramos que o uso isolado de corticoide em camundongos naïve não interfere nos níveis de CD39, contudo a inflamação induzida pelo modelo gera um aumento do MFI (*median fluorescence intensity*) do CD39 nas Treg circulantes, que é revertida após o tratamento com MTX e dexametasona. Dessa forma, este estudo corrobora o papel do CD39 como potencial biomarcador preditor de resposta terapêutica ao metotrexato e desenvolvemos um método mais simples, rápido e barato de fazê-lo. Além disso, com o modelo experimental de artrite avaliamos a dinâmica das células TregCD39+, onde demonstramos um papel dinâmico da expressão de CD39 no controle da inflamação.

**PALAVRAS-CHAVE:** artrite reumatoide; metotrexato; células T reguladoras; CD39; biomarcador

## ABSTRACT

MACHADO, CC. **Prediction of therapeutic response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis through the analysis of CD39 in regulatory T cells.** Doctoral dissertation – Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease that affects 1% of the world's population and is characterized by an infiltration of immune system cells in the synovial tissue. The first-line treatment of RA is low-dose methotrexate (MTX). However, a considerable proportion of patients with RA are refractory to this medication (60%) and the mechanism by which this phenomenon occurs has yet to be established. The anti-inflammatory effect of MTX is associated with its ability to increase extracellular levels of adenosine, which in turn has an immunomodulatory action. In this context, a study by our group demonstrated that RA patients unresponsive to MTX treatment have a lower expression of CD39 on regulatory T cells (Tregs) isolated from PBMC and analyzed by flow cytometry. This ectonucleotidase is one of the main pathways for producing extracellular adenosine through the metabolism of ATP and ADP. Thus, we performed a single-center prospective study, including 69 treatment-naïve RA patients, subsequently submitted to treatment with methotrexate. We corroborate the correlation of low expression of CD39 on Treg at diagnosis as a biomarker of therapeutic response, using Treg isolated not only from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) but also from white blood cells (WBC), using a faster, simpler, and cheaper technique. We found that the Disease Activity Score - 28 Joints (DAS28), age, gender, smoking status, rheumatoid factor and ACPA levels do not correlate with different CD39 expression. We sought to complement the accuracy in predicting therapeutic response by measuring 42 inflammatory cytokines in peripheral blood, finding that high levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) and interleukin 17 (IL-17) at the diagnosis are associated with a higher risk of MTX unresponsiveness. Finally, using an experimental model of arthritis, we demonstrated that corticosteroids in wild type mice does not interfere with the expression of CD39 on Treg, however, the inflammation induced by arthritis generates an increase of the MFI (median fluorescence intensity) of CD39 on circulating Treg, which is reversed after treatment with MTX and dexamethasone. Thus, this study corroborates the role of CD39 as a potential biomarker to predict therapeutic response to methotrexate and we have developed a more straightforward, faster, and cheaper method to do so. Additionally, we used experimental arthritis to assess the dynamics of TregCD39+ cells, demonstrating a dynamic role for CD39 expression in antigen-induced arthritis.

**KEYWORDS:** rheumatoid arthritis; methotrexate; regulatory T cells; CD39; biomarker

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Aspectos etiológicos, patogênicos e clínicos da artrite reumatoide.....	23
FIGURA 2 – Mecanismo de ação do MTX através da modulação do sistema purinérgico.....	39
FIGURA 3 – Organograma representativo do delineamento experimental.....	46
FIGURA 4 – Estratégia de <i>gates</i> empregada na citometria de fluxo das Treg humanas .....	48
FIGURA 5 – Modelo experimental de Artrite Induzida por Antígeno (AIA) em camundongos.....	50
FIGURA 6 – Teste de von Frey eletrônico.....	51
FIGURA 7 – Estratégia de <i>gates</i> na citometria de fluxo das Treg de camundongos AIA .....	52
FIGURA 8 – Fluxograma de pacientes incluídos na pesquisa.....	54
FIGURA 9 – Expressão de CD39 em células CD4+CD25+FOXP3+CD39+.....	56
FIGURA 10 – Expressão de CD39 em células CD4+CD25+CD39+.....	56
FIGURA 11 – Curva ROC do MFI de CD39 nas Treg.....	57
FIGURA 12 – Expressão do CD39 de acordo com a atividade da doença.....	58
FIGURA 13 – Correlação entre a expressão do CD39 e variáveis secundárias.....	58
FIGURA 14 – Expressão do CD39 em pacientes tratados com leflunomida e anti-TNF.....	59
FIGURA 15 – Expressão do CD39 em indivíduos saudáveis.....	59
FIGURA 16 – Expressão diferencial de citocinas em MTX-R e MRX-NR.....	60
FIGURA 17 – Modulação de citocinas plasmáticas após o tratamento com MTX.....	61
FIGURA 18 – Perfil de citocinas inflamatórias na AR.....	63
FIGURA 19 – Artrite induzida antígeno em camundongos .....	64
FIGURA 20 – Efeito do tratamento com metotrexato nas Treg em camundongos.....	66
FIGURA 21 – Efeito do tratamento com dexametasona nas Treg em camundongos.....	67

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Drogas antirreumáticas e seus mecanismos de ação.....	26
TABELA 2 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com AR.....	55
TABELA 3 – Citocinas como biomarcadores de resposta ao MTX.....	61
TABELA 4 – Evolução das citocinas em pacientes MTX-R.....	62
TABELA 5 – Evolução das citocinas em pacientes MTX-NR.....	62
TABELA 6 – Citocinas diferencialmente expressas na AR .....	64
TABELA 7 – Citocinas séricas em modelo experimental de artrite .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR: do inglês *American College of Rheumatology*

ADA: adenosina deaminase

ADO: adenosina

ADP: difosfato de adenosina

AIA: artrite induzida por antígeno

AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo

AINE: anti-inflamatório não esteroide

AK: adenosina kinase

AMP: monofosfato de adenosina

Anti-CCP: anticorpo anti peptídeo citrulinado cíclico

APC: do inglês *antigen-presenting cells*

AR: artrite reumatoide

ARi: artrite reumatoide inicial

ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo formiltransferase

ATP: trifosfato de adenosina

BAFF: fator ativador de células B

Bari: baricitinibe

BLyS: estimulador de linfócitos B

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAR-T cells: células T com receptor de antígeno quimérico

CD: cluster de diferenciação

CD39: ectonucleotídeo trifosfato difosfohidrolase 1

CD73: ecto5'-nucleotidase

CD: célula dendrítica

CDAI: índice clínico de atividade de doença

CEP: comitê de ética em pesquisa

CEUA: comitê de ética no uso de animais

CFA: adjuvante de Freund completo

CIA: artrite induzida por colágeno

CRID: Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias

CTLA4: proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos

DAMP: padrão molecular associado a dano

DAS28: escore de atividade da doença – 28 articulações

DEXA: dexametasona

DM: diabetes mellitus

DMCD: droga modificadora do curso da doença

DMCDB: droga modificadora do curso da doença biológica

DMCDsc: droga modificadora do curso da doença sintética convencional

DMCDsg: droga modificadora do curso da doença sintética guiada

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio padrão

EC: epítipo compartilhado

ETA: etanercepte

EULAR: do inglês *European League Against Rheumatism*

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Fc: fragmento cristalizável

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

FMO: controle de fluorescência por subtração de um fluorocromo

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FOXP3: forkhead box P3

FR: fator reumatoide

G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GWAS: estudos de associação genômica ampla

HAQ-DI: questionário de avaliação de saúde - índice de incapacidade

HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

HLA: antígenos leucocitários humano

IC: intervalo de confiança

IFN: interferon

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

IPEX: síndrome de desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X

JAK: Janus kinase

LID: Laboratório de Inflamação e Dor



mBAS: albumina bovina sérica metilada  
MBDAS: escore de atividade de doença de múltiplos biomarcadores  
MFI: média de intensidade da fluorescência  
MIP: proteína inflamatória de macrófagos  
MTX: metotrexato  
MTX<sub>glu</sub>: metotrexato poliglutamato  
MTX-NR: não respondedores ao tratamento com metotrexato  
MTX-R: respondedores ao tratamento com metotrexato  
NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos  
NK: células natural killers  
NS: não significativo  
OR: razão de probabilidade  
PAD: peptidil arginina deaminase  
PBMC: células mononucleares do sangue periférico  
PBS: tampão fosfato-salino  
PCFT: transportador de folato acoplado a próton  
PCR: proteína C reativa  
PFA: paraformaldeído  
PIU: pneumonia intersticial usual  
RANK: ativador do receptor do fator nuclear kappa B  
RANKL: ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa B  
REUC: Ambulatório de Artrite Reumatoide Inicial  
RFC1: transportador de folato reduzido 1  
RNA: ácido ribonucleico  
RR: risco relativo  
SDAI: índice simplificado de atividade da doença  
ST: sangue total  
T2T: tratar para atingir  
TBG: tabagismo  
TCR: receptor de células T  
TGO: transaminase oxalacética  
TGP: transaminase pirúvica  
Th: célula T auxiliar  
TLR: receptor do tipo Toll

TNF: fator de necrose tumoral

Treg: células T reguladoras

USP: Universidade de São Paulo

VHS: velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Artrite Reumatoide.....</b>	<b>16</b>
1.1.1. Etiologia.....	16
1.1.2. Fisiopatologia.....	19
1.1.3. Manifestações clínicas.....	23
1.1.4. Tratamento.....	25
1.1.5. Impacto social e econômico.....	29
<b>1.2. Células T reguladoras.....</b>	<b>30</b>
1.2.1. Classificação das Treg.....	31
1.2.2. Mecanismos imunossupressores.....	32
1.2.3. Treg e autoimunidade.....	33
<b>1.3. Metotrexato.....</b>	<b>36</b>
1.3.1. Farmacocinética e farmacodinâmica.....	36
1.3.2. Mecanismo de ação.....	37
1.3.3. O binômio ATP-adenosina e a resposta inflamatória.....	39
1.3.4. Resistência ao tratamento com metotrexato.....	41
1.3.5. CD39 como biomarcador de resposta ao metotrexato.....	42
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>43</b>
2.1. Objetivo geral.....	43
2.2. Objetivos específicos.....	43
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>44</b>
3.1. Recrutamento e estratificação de pacientes.....	44
3.2. Separação de células e plasma.....	46
3.3. Fenotipagem de linfócitos humanos por citometria de fluxo.....	47
3.4. Dosagem de citocinas e quimiocinas.....	48
3.5. Modelo experimental de artrite.....	49
3.6. Avaliação de dor e edema articular em camundongos.....	50
3.7. Coleta de sangue e linfonodos dos camundongos.....	51
3.8. Fenotipagem de linfócitos murinos por citometria de fluxo.....	51
3.9. Análise estatística.....	52
<b>4. Resultados.....</b>	<b>54</b>
4.1. Caracterização clínica dos pacientes com AR.....	54

4.2. Expressão de CD39 em Treg circulantes em indivíduos com AR.....	55
4.3. Perfil de citocinas e quimiocinas plasmáticas na AR.....	60
4.4. Expressão de CD39 em Treg na artrite experimental.....	64
4.5. Citocinas séricas em modelo experimental de artrite.....	68
5. Discussão.....	71
6. Conclusões.....	78
7. Referências Bibliográficas.....	79
8. Apêndices.....	96
8.1. Apêndice I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	96
9. Anexos.....	97
9.1. Anexo I – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa....	97
9.2. Anexo II – Critérios Classificatórios ACR/EULAR 2010 .....	104
9.3. Anexo III – DAS28.....	105
9.4. Anexo IV – HAQ-DI.....	106

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de natureza autoimune que acomete 0,5-1% da população mundial, afetando predominantemente mulheres após a quinta década de vida. Clinicamente expressa-se por poliartrite simétrica predominantemente nas pequenas articulações, com evolução crônica e progressiva caso não tratada precocemente. A inflamação da membrana sinovial (tecido que reveste internamente a cavidade articular) resulta na destruição progressiva do tecido cartilaginoso, erosões ósseas e perda da função articular quando a doença não é devidamente controlada (SMOLEN *et al.*, 2018). Devido ao seu caráter crônico, a AR está associada a um elevado impacto socioeconômico, uma vez que pode levar a consideráveis limitações das atividades cotidianas e altos índices de absentismo no trabalho (HSIEH *et al.*, 2020; MARTIKAINEN *et al.*, 2016).

Nas últimas duas décadas houve uma verdadeira revolução na compreensão da sua fisiopatologia, o que levou ao desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença, como imunobiológicos com ação anti-TNF, anti-IL6, bloqueadores de coestimulação de linfócitos T, e, mais recentemente, pequenas moléculas inibidoras de sinalização intracelular. Apesar disso, cerca de 20% dos pacientes não respondem aos tratamentos disponíveis e remissão livre de tratamento ainda é uma realidade para a minoria dos pacientes, enquanto a utilização das novas drogas geraram um crescimento exponencial nos custos do tratamento (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Assim, métodos para a personalização do tratamento da AR são necessários não apenas para a obtenção da remissão em um curto intervalo de tempo, como também reduzir a exposição desnecessária a medicamentos imunossupressores e mitigar os custos de assistência à saúde.

### 1.1.1 Etiologia

A AR é uma doença multifatorial, influenciada tanto por fatores genéticos e quanto estocásticos (condições ambientais, fatores demográficos e estilo de vida). Um clássico estudo sueco estima que a hereditariedade possa ser responsável pelo

desenvolvimento da AR em cerca de 40% dos casos, sendo os fatores genéticos ainda mais influentes nos casos de AR de início precoce e em pacientes com anticorpos anti peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) em títulos elevados nos plasma (FRISELL *et al.*, 2013). De maneira surpreendente, estudos de associação ampla do genoma (GWAS – do inglês *Genome-Wide Association Studies*) demonstraram mais de 100 loci gênicos significativamente associados ao maior risco de desenvolvimento de AR, embora a maioria confira um risco relativo baixo (EYRE *et al.*, 2012; OKADA *et al.*, 2014a; STAHL *et al.*, 2010).

Alterações no complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) permanecem como o maior fator de risco genético para o desenvolvimento da AR (DEDMON, 2020). O MHC trata-se um conjunto de proteínas ubiquamente expressas na superfície celular que têm a função de auxiliar o sistema imunológico na discriminação entre antígenos externos e componentes naturais do organismo (KRENSKY, 1997). Nos humanos, esse complexo é conhecido como sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *human leukocyte antigens*). As moléculas HLA de classe II (constituídas por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ ) são particularmente expressas em células apresentadoras de antígenos e são essenciais para o reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos extracelulares aos linfócitos T CD4+ (BROWN *et al.*, 1993). Os genes do sistema HLA são altamente polimórficos e cada molécula HLA reconhece um grupo específico de epítomos (DUQUESNOY; TRUCCO, 1988). No caso da AR, os alelos que conferem maior risco à doença apresentam sequências de aminoácidos em comum (QKRAA/QRRAA/RRRAA) na cadeia  $\beta$ 1 no local de ligação ao peptídeo (posições 70 a 74 da terceira região hipervariável), sendo por isso também conhecidos como “epítomos compartilhados” (GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987; RAYCHAUDHURI *et al.*, 2012). Dessa forma, indivíduos com o “epítomo compartilhado” possuem moléculas do HLA de classe II com predisposição ao reconhecimento e subsequente apresentação de autoantígenos a células T, gerando uma resposta imune adaptativa contra proteínas endógenas e consequente maior risco de adoecimento (PIANTA *et al.*, 2017).

Outros genes também relacionados ao desenvolvimento da AR são: PTPN22 e CTLA4 (relacionados à função de células T), PADI4 (relacionado a citrulinização de proteínas endógenas), TNF, TNFAIP3, TRAF1, IRF4, IRF5 e GATA3 (citocinas pró-inflamatórias, receptores e moléculas de sinalização intracelular) (VIATTE; BARTON,

2017). Um importante estudo do nosso grupo sugere que a expressão gênica diferencial em pacientes com AR tem o potencial de auxiliar na predição de resposta terapêutica ao metotrexato e terapia anti-TNF (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O tabagismo é o fator de risco modificável mais importante da AR e tem ação sinérgica com o perfil HLA. Paciente tabagistas que possuem duas cópias do epítipo compartilhado (EC) possuem um risco relativo (RR) para o desenvolvimento da doença de 21.0, enquanto não tabagistas com duas cópias do EC têm um RR de 5.4 e tabagistas negativos para o EC têm um RR de 1.5 quando comparados ao grupo controle de não tabagistas negativos para o EC (KLARESKOG *et al.*, 2006). Além disso, o consumo de tabaco está associado a doença mais agressiva e refratária ao tratamento. Diversos mecanismos foram identificados sobre o papel do tabaco no desenvolvimento e evolução da AR, dentre eles a indução de enzimas capazes de realizar citrulinização de proteínas endógenas (geração de neoantígenos) no epitélio pulmonar, ativação de linfócitos Th17 (linfócitos T auxiliares produtores de interleucina 17) via receptor aril-hidrocarboneto (AhR) e indução de formação de osteoclastos (subtipos de macrófagos responsáveis por causar erosões ósseas na AR) (DONATE *et al.*, 2021; TALBOT *et al.*, 2018).

Alterações do microbioma oral, intestinal e pulmonar também estão associadas ao desenvolvimento da doença. *Porphyromonas gingivalis*, bactéria altamente prevalente na cavidade oral em pacientes com AR, tem a capacidade de citrulinar proteínas por meio da expressão da enzima peptidilarginina deaminase 4 (PADI4), dessa forma contribuindo para a formação de neoantígenos e desenvolvimento de autoanticorpos (MIKULS *et al.*, 2012). A periodontite (infecção bacteriana dos tecidos que envolvem os dentes) é mais prevalente em pacientes com AR e está associada a provas inflamatórias mais elevadas, doença mais ativa e níveis elevados de NETs (do inglês *neutrophil extracellular traps*) no plasma e saliva, achados parcialmente revertidos após o tratamento da doença periodontal (OLIVEIRA, S. R. *et al.*, 2021; SCHER *et al.*, 2012). Já no intestino, *Prevotella copri* é a bactéria que mais se associa com o desenvolvimento da doença, provavelmente via desenvolvimento de colite, ativação de células T autorreativas no intestino e translocação bacteriana (SCHER *et al.*, 2013). Outros agentes infecciosos também postulados como gatilhos da AR são vírus Epstein-Barr, parvovirus B19, hepatite B e C, rubéola, Chikungunya, *Mycoplasma pneumoniae*, *Proteus mirabilise* e *Escherichia coli*, provavelmente via mimetismo molecular (semelhança entre epítomos endógenos e

exógenos gerando uma resposta imune aos primeiros após uma exposição aos segundos) e resposta disfuncional dos receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) (ARLEEVSKAYA *et al.*, 2020; EBRINGER; WILSON, 2000; HITCHON; EL-GABALAWY, 2011). Na literatura, existem estudos conflitantes sobre o risco de AR e exposição a poluição, etilismo, obesidade, atividade física, estresse psicológico, níveis de vitamina D e uso de estatinas.

### 1.1.2 Fisiopatologia

A AR surge possivelmente quando gatilhos externos desencadeiam uma resposta autoimune contra a sinóvia em pessoas geneticamente susceptíveis. O primeiro indício de que a AR pudesse ter uma origem autoimune foi a descoberta de autoanticorpos direcionados contra o fragmento cristalizável (região Fc) de imunoglobulinas G (IgGs), posteriormente denominados fator reumatoide (FR) (WAALER, 1939). Estudos subsequentes mostraram que linfócitos de pacientes com AR, ao secretar o FR que reconhecem IgGs endógenas, geram uma resposta inflamatória autoimune mediada pela ativação clássica do sistema complemento e espécies reativas de oxigênio (DÖRNER *et al.*, 2004; GRINNELL; YOSHIDA; JASIN, 2005; MUESUGI, T HAYASHI, 1998). Hoje em dia, o FR é um importante biomarcador diagnóstico da AR (sensibilidade de 60-80% e especificidade de 60-70%) e está associado uma doença mais agressiva (DE RYCKE, L. *et al.*, 2004; NISHIMURA *et al.*, 2007).

A detecção de anticorpos anti peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) em pacientes com AR é mais uma evidência da natureza autoimune da doença. As enzimas peptidil arginina deaminase (PADs) têm a capacidade de citrulinar resíduos do aminoácido arginina em diversas proteínas do organismo, tais como vimentina, fibrinogênio, fibrina, histona, colágeno tipo II e alfa-enolase (DE RYCKE, Leen *et al.*, 2005; SCHELLEKENS *et al.*, 1998). Este processo, conhecido como citrulinação (conversão de arginina em citrulina), tem o potencial de gerar neoantígenos, que são proteínas capazes de serem reconhecidas como “estranhas” (*non-self*) pelo sistema imune. Pacientes portadores do “epítipo compartilhado” (alelos HLA-DRB1) têm maior propensão a reconhecer proteínas citrulinadas como autoantígenos, o que é corroborado pelo fato de que alterações no sistema HLA aumentam o risco de



desenvolvimento de AR anti-CCP positivo, mas não anti-CCP negativo (OKADA *et al.*, 2014b). Além de fatores endógenos, o tabagismo e infecção por bactérias produtoras de PAD (como a *Porphyromonas gingivalis*) também estão associados à citrulinização de peptídeos. Assim como no caso do FR, a detecção de anticorpos anti-CCP possui valor diagnóstico e prognóstico, tendo uma sensibilidade semelhante ao FR, porém uma especificidade de 90-95% (DE RYCKE, L. *et al.*, 2004; NISHIMURA *et al.*, 2007). Além disso, possuem ação patogênica, uma vez que ativam macrófagos e osteoclastos, levando a erosão cartilaginosa e óssea (HARRE *et al.*, 2012). Curiosamente, anticorpos anti-CCP podem ser identificados até 10 anos antes do diagnóstico da doença, sugerindo que a desregulação do sistema imunológico antecede em muitos anos o início da inflamação articular e provavelmente inicia-se fora da articulação, em órgãos linfoides (NIELEN *et al.*, 2004; WEYAND; GORONZY, 2021).

Outros mecanismos também descritos como geradores de neoepítopos associados ao desenvolvimento da AR são a carbamilação (modificação pós-translacional não enzimática que converte lisina em homocitrulina), acetilação (acetilação do terminal N e acetilação de lisina) e adutos de malondialdeído-acetaldeído (produtos que se originam da peroxidação lipídica em células expostas a espécies reativas de oxigênio), porém, diferentemente do FR e anti-CCP, ainda não são utilizados na prática clínica (SHI *et al.*, 2011; THIELE *et al.*, 2015).

O grande marco da AR é o infiltrado inflamatório de diversas células do sistema imune inato e adaptativo no tecido sinovial, dentre elas neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T, macrófagos e monócitos. Esse tecido inflamatório altamente invasivo, também conhecido como "*pannus*" (do latim, pano), tem um comportamento tumor-like, uma vez que atua sobre baixas concentrações de oxigênio, expressa fatores de resistência a apoptose e outros mecanismos de imunoevasão, possui elevada taxa de replicação celular e é altamente vascularizado (FEARON *et al.*, 2016).

Inicialmente, células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*) reconhecem epítopos presentes na sinóvia (ex: colágeno citrulinado) e apresentam via sistema HLA de classe II a células T CD4+, que são ativadas e diferenciadas, passando então a produzir citocinas pró-inflamatórias (WEHR *et al.*, 2019). Os linfócitos T representam 40-50% das células presentes na sinóvia reumatoide, sendo as células T auxiliares (Th, do inglês *T helpers*) do tipo 1 (Th1) e do tipo 17 (Th17) particularmente importantes para o desenvolvimento da doença.

Células Th1 atuam principalmente por meio da produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que auxilia na ativação de macrófagos e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*). Já as células Th17, como o próprio nome sugere, produzem IL-17, importante citocina que atua na fase inicial da doença ativando macrófagos, fibroblastos e condrócitos (VAN HAMBURG; TAS, 2018; VYAS; HANSDA; GOSWAMI, 2019).

Os linfócitos B, assim como as células dendríticas, podem atuar como APCs e apresentar antígenos aos linfócitos T que, por sua vez, além de citocinas pró-inflamatórias, liberam também quimiocinas que atuam sobre os linfócitos, tais como CXCL13 e CCL20 (ARMAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Esse microambiente inflamatório e quimiotático, associado à coestimulação desempenhada pelos linfócitos T, induz a ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de autoanticorpos (ex: FR e anti-CCP). Com a evolução da doença, ocorre a formação de órgãos linfoides terciários (TLO, do inglês *Tertiary Lymphoid Organ*) na sinóvia, que consiste em tecido organizado onde se concentram linfócitos T e linfócitos B autorreativos que atuam perpetuando o processo inflamatório (BUCKLEY *et al.*, 2015). O ligante indutor de proliferação (APRIL, do inglês *proliferation-inducing ligand*) e o fator de ativação de células B da família TNF (BAFF, do inglês *B-cell activation factor of the TNF family*; também conhecido como BLyS, do inglês *B lymphocyte stimulator*) desempenham um papel fundamental na ativação, estabilização e proliferação de linfócitos B e plasmócitos (NG; MACKAY; MACKAY, 2005; SCHNEIDER, P., 2005).

O papel dos neutrófilos vem ganhando destaque na fisiopatologia da AR após a descoberta das NETs (do inglês *neutrophil extracellular traps*), que são estruturas em forma de rede contendo grandes quantidades de cromatina associada a diversos peptídeos com propriedades pró-inflamatórias e bactericidas (O'NEIL; KAPLAN, 2019). A NETosis (processo de liberação de NETs) permite a exteriorização de autoantígenos citrulinados, estando correlacionado com níveis mais elevados de anticorpos anti-CCP e produção de citocinas pró-inflamatórias (KHANDPUR *et al.*, 2013). Adicionalmente, as NETs contribuem para a hiperalgesia através da ativação dos receptores TLR-4 e TLR-9. Curiosamente, a degradação das NETs através do tratamento com DNase é capaz de reduzir dor, edema, citocinas inflamatórias e

erosões articulares em modelo experimental de artrite (SCHNEIDER, A. H. *et al.*, 2021).

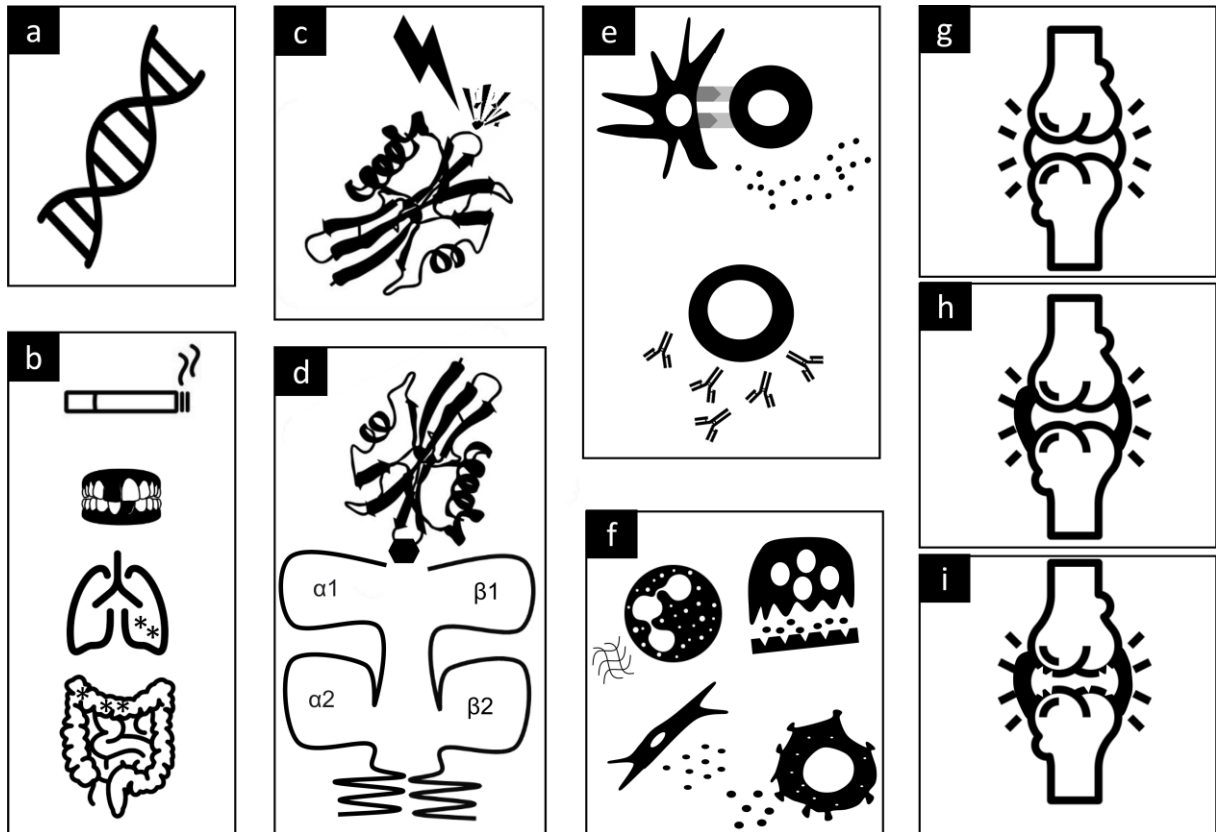
Dentre os principais responsáveis pelo dano articular na AR estão os macrófagos. Estas células são ativadas por meio da ação de citocinas produzidas por linfócitos T (IFN- $\gamma$  e IL-17) e fibroblastos (IL-6 e RANKL - *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B*), imunoglobulinas (FR e anti-CCP), imunocomplexos e sistema complemento. São importantes perpetuadores da inflamação, uma vez que produzem grande quantidade de IL-1, IL-6 e TNF, o que induz o fenótipo inflamatório de linfócitos, fibroblastos e condrócitos (TU *et al.*, 2020; UDALOVA; MANTOVANI; FELDMANN, 2016). Osteoclastos (um subtipo de macrófago presente no tecido ósseo) sofrem ativação e diferenciação via citocinas pró-inflamatórias (principalmente TNF e IL-6) e RANK, causando reabsorção óssea e erosões (FANG; ZHOU; NANDAKUMAR, 2020).

Nas articulações, os fibroblastos são muito importantes para a estruturação da sinóvia. Representam 80% das células presentes na camada mais superficial (chamada camada íntima, que está em contato com o líquido sinovial), mas também estão presentes na camada mais profunda do tecido sinovial (chamada camada sub-íntima) (FIRESTEIN *et al.*, 2012). A análise transcriptômica de fibroblastos sinoviais de pacientes com AR sugere que estas células sofrem modificações pós-translacionais permanentes após o estímulo com citocinas pró-inflamatórias, passando para um perfil agressivo e patológico que produz diversas citocinas pró-inflamatórias (principalmente IL-6), metaloproteinases (enzimas que degradam a cartilagem) e RANKL (citocina crucial para ativação de osteoclastos). Mesmo após a remoção do estímulo inflamatório, os fibroblastos permanecem com o fenótipo agressivo evidenciado em estudos *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que estas células podem ter um importante papel em pacientes com AR resistente a todos os tratamentos atualmente disponíveis. No presente momento, diversos grupos estudam os fibroblastos como possíveis novos alvos terapêuticos na AR (AUNGIER *et al.*, 2019; BUCKLEY *et al.*, 2021; FILER *et al.*, 2017). Alterações epigenéticas, como hipometilação do DNA, contribuem para esta hiperativação dos fibroblastos e contribuem para maior resistência às terapias convencionais (KAROOUZAKIS *et al.*, 2009).

Em suma, diversos grupos celulares estão envolvidos na etiopatogenia da AR e diversas vias de sinalização (redundantes e não redundantes) permitem que esse microambiente inflamatório funcione de modo coordenado e agressivo. A **Figura 1**

ilustra a evolução doença. Se, por um lado, grandes avanços foram obtidos na compreensão da AR, por outro, reconhece-se que dificilmente exista uma *silver bullet* capaz de bloquear essa resposta inflamatória em toda a sua extensão.

Figura 1 - Aspectos etiológicos, patogênicos e clínicos da artrite reumatoide.



**a)** Indivíduos geneticamente predispostos (genes HLA-DRB1, PTPN22, CTLA4, PADI4...) são expostos a **b)** fatores ambientais (tabagismo, periodontite, infecção pulmonar, alterações no microbioma intestinal), gerando a formação de **c)** neopíptopos (proteínas endógenas citrulinadas, carbamiladas e acetiladas) que são reconhecidos e apresentados por meio de **d)** moléculas do Sistema HLA de classe II, gerando inicialmente uma resposta de **e)** células do sistema imune adaptativo (linfócitos B passam a produzir autoanticorpos como FR e anti-CCP, enquanto linfócitos T liberam citocinas pró-inflamatórias como IFN e IL7). Posteriormente, ocorre a ativação de **f)** células do sistema imune inato (neutrófilos, que produzem NETs; macrófagos, que produzem IL-1, IL-6 e TNF; osteoclastos, que promovem degradação óssea) e células estromais (fibroblastos, que sofrem *imprint* inflamatório e passam a produzir IL-6, RANKL e metaloproteinases). Clinicamente, os pacientes evoluem com **g)** artralgia inespecífica, que pode durar semanas ou mesmo anos, seguida da **h)** inflamação articular e, por fim, **i)** degradação cartilaginosa e erosões ósseas.

### 1.1.3 Manifestações clínicas

Clinicamente, a AR caracteriza-se por uma poliartrite simétrica aditiva predominante em pequenas articulações das mãos e dos pés, mas podendo também afetar grandes articulações, como cotovelos e joelhos. As articulações

interfalangianas proximais e metacarpofalângicas são particularmente bastante afetadas, enquanto as interfalângicas distais costumam ser poupadas. No início da doença, geralmente ocorre dor articular de ritmo inflamatório, ou seja, pior ao despertar e com melhora progressiva ao longo do dia. Essa característica está associada tanto ao acúmulo de líquido sinovial com o repouso articular durante a noite, como ao padrão circadiano de produção de cortisol (mais baixo durante a noite e elevando-se progressivamente ao longo da manhã). Por razões semelhantes, ocorre também a sensação de rigidez matinal, onde os pacientes relatam resistência para movimentar as articulações das mãos no início da manhã, classicamente podendo durar mais de 30 minutos (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

Após a fase de artralgia, que pode durar de algumas semanas a vários meses, ocorre artrite, inicialmente detectada apenas ao estudo com ultrassom (observa-se um aumento do fluxo sanguíneo visto ao Doppler colorido e espessamento da membrana sinovial visualizado em escala de cinza) e, posteriormente, clinicamente detectada com a inspeção e palpação do espessamento sinovial. O marco semiológico das articulações afetadas pela AR é um edema amolecido (em decorrência do derrame articular e espessamento da sinóvia) que adquire um aspecto fusiforme, o que a diferencia do aumento do volume articular que ocorre na osteoartrite (secundário à formação de osteófitos e pequeno componente de espessamento sinovial) (SMOLEN, 2018).

Quando não tratada precocemente, ocorre progressão do dano articular, que pode ser observada ao raio X. A manifestação radiográfica inicial é o aumento do tecido sinovial (comumente descrito como aumento de partes moles), seguido da osteopenia periarticular. Após, aparecem erosões inicialmente localizadas na junção entre a sinóvia e a cartilagem articular (descritas como erosões periarticulares). Com a progressão da doença, surgem erosões por toda a epífise óssea, redução do espaço articular, subluxação e, por fim, anquilose (fusão das superfícies articulares) (LLOPIS *et al.*, 2017).

Adicionalmente, a AR pode causar uma grande variedade de manifestações extrarticulares, tais como inflamação ocular (esclerite e episclerite), nódulos reumatóides (infiltrado de macrófagos e linfócitos, mais comumente vistos no tecido subcutâneo de áreas de atrito e nos pulmões), doença pulmonar intersticial (principalmente PIU – pneumonia intersticial usual), vasculite (geralmente de pequenos vasos e com acometimento cutâneo), síndrome de Felty (neutropenia

secundária ao hiperesplenismo) e maior risco de morte por eventos cardiovasculares. A maioria dessas manifestações está relacionada a níveis elevados de autoanticorpos, depósito de imunocomplexos e ativação do sistema complemento, doença grave, de longa data e/ou subtratada. Felizmente, com o tratamento precoce e advento das novas terapias, essas manifestações são cada vez menos observadas na prática clínica (FIGUS *et al.*, 2021).

#### 1.1.4 Tratamento

A AR é ainda hoje considerada uma doença incurável, embora com as novas terapias seja possível um bom controle da doença na maioria dos pacientes. Para o alívio inicial dos sintomas, com frequência é necessário o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ou glicocorticoides pelo seu rápido início de ação. Contudo, em decorrência dos diversos efeitos colaterais e por não alterarem o curso da doença, são medicações utilizadas pelo menor período e na menor dose possíveis (SMOLEN *et al.*, 2020).

As drogas modificadoras do curso da doença (DMCDs), como o próprio nome sugere, reduzem não apenas os sintomas, mas também a progressão da lesão articular. São classificadas em drogas sintéticas (pequenas moléculas administradas via oral) e biológicas (moléculas proteicas administradas de forma parenteral). As drogas sintéticas são, por sua vez, subcategorizadas em DMCDs sintéticas convencionais (como o MTX e a leflunomida) e DMCDs sintéticas guiadas (moléculas que interferem na sinalização intracelular, como o tofacitinibe e baricitinibe). A **Tabela 1** apresenta as DMCDs aprovadas para o tratamento da AR no Brasil (CONITEC, 2019).

Uma vez realizado o diagnóstico, utiliza-se a estratégia com meta terapêutica (*treat to target* – T2T), onde as decisões terapêuticas são compartilhadas com os pacientes, a atividade da doença é avaliada regularmente por meio de escores clínicos estruturados e validados, pacientes com doença ativa têm o tratamento ajustado no mínimo a cada 3 meses e a meta é a remissão clínica. Quanto não alcançada, baixa atividade da doença pode ser tolerada a depender do caso (SMOLEN, J. S. *et al.*, 2016).

O tratamento inicial consiste na utilização de uma DMCD sintética convencional (DMCDsc) geralmente associada a baixa dose de corticoide, sendo este último rapidamente desmamado após alívio dos sintomas (idealmente nos primeiros 3 meses). O MTX, droga que atua aumentando os níveis extracelulares de adenosina, induz boa resposta terapêutica em 40-50% dos pacientes (CRONSTEIN; AUNE, 2020). Na sua falha, a leflunomida costuma ser a segunda opção, atuando reduzindo a síntese de pirimidinas, tendo assim uma ação antiproliferativa nas células do sistema imune. A sulfassalazina e hidroxicloroquina, apesar de serem consideradas DMCDs, são utilizadas em casos selecionados, a primeira por ter um elevado índice de eventos adversos (principalmente gastrointestinais) e a segunda pela eficácia inferior às demais DMCDsc (FRAENKEL *et al.*, 2021).

**Tabela 1 - Drogas antirreumáticas e seus mecanismos de ação.**

<b>DROGA</b>	<b>CLASSE</b>	<b>MECANISMO DE AÇÃO</b>
Metotrexato	DMCD sintético convencional	Aumento da síntese de adenosina*
Leflunomida	DMCD sintético convencional	Inibe a síntese de pirimidinas
Hidroxicloroquina	DMCD sintético convencional	Aumenta o pH lisossomal*
Sulfassalazina	DMCD sintético convencional	Aumento da síntese de adenosina*
Infliximabe	DMCD biológico	Bloqueia o TNF solúvel e de superfície
Etanercepte	DMCD biológico	Bloqueia o TNF solúvel
Adalimumabe	DMCD biológico	Bloqueia o TNF solúvel e de superfície
Golimumabe	DMCD biológico	Bloqueia o TNF solúvel e de superfície
Certolizumabe	DMCD biológico	Bloqueia o TNF solúvel e de superfície
Rituximabe	DMCD biológico	Ação anti-CD20 (linfócitos B)
Tocilizumabe	DMCD biológico	Bloqueia o receptor da IL-6
Abatacepte	DMCD biológico	Bloqueia a coestimulação de linfócitos T
Tofacitinibe	DMCD sintético guiado	Inibição da JAK1 e JAK3
Baricitinibe	DMCD sintético guiado	Inibição da JAK1 e JAK2
Upadacitinibe	DMCD sintético guiado	Inibição da JAK1

\*Possuem mais de um mecanismo de ação, sendo apresentado o principal mecanismo no tratamento da AR. DMCD: droga modificadora do curso da doença; TNF: tumor necrosis fator; JAK: Janus kinase

Após a falha a um ou mais DMCDsc, a próxima etapa consiste na associação de uma DMCD biológica (DMCDB). As medicações anti-TNF, por serem utilizadas a mais tempo e terem um perfil de segurança mais conhecido, costumam ser as DMCDb de primeira escolha. O primeiro a ser desenvolvido foi o infliximabe, aprovado para o

tratamento da AR no início dos anos 2000. Consiste em um anticorpo monoclonal quimérico (possui componentes humano e murino em sua molécula) com afinidade tanto contra a molécula TNF solúvel quanto à localizada na superfície celular. Em seguida foi desenvolvido o etanercepte, uma proteína de fusão do receptor de TNF p75 que se liga ao TNF solúvel. O terceiro foi o adalimumabe, anticorpo monoclonal recombinante completamente humano, o que lhe confere a vantagem de ser menos imunogênico e induzir menos anticorpos antidroga (consequentemente, menos falha secundária). Por fim, vieram o golimumabe, também um anticorpo monoclonal recombinante completamente humano, e o certolizumabe pegol, que consiste em um fragmento Fab de um anticorpo monoclonal humanizado acoplado a uma molécula de polietileno glicol, o que lhe confere maior estabilidade, meia-vida mais longa e menor passagem placentária e para o leite materno. Em geral, os cinco anti-TNF possuem uma eficácia semelhante. O infliximabe é único de administração endovenosa e, por ser quimérico, é o mais imunogênico. O restante é de administração subcutânea semanal (etanercepte), quinzenal (adalimumabe) e mensal (golimumabe). O certolizumabe pegol pode ser administrado quinzenalmente ou mensalmente, a depender da escolha do paciente (FELDMANN, 2002; RADNER; ALETAHA, 2015; UDALOVA, I. *et al.*, 2016)

O rituximabe, anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20, foi inicialmente desenvolvido para o tratamento de linfoma, porém foi observado que paciente tratados com a medicação e que apresentavam artrite reumatoide como comorbidade evoluíam com melhora da inflamação articular (EDWARDS; CAMBRIDGE, 2001; M STEWART, V MALKOVSKA, J KRISHNAN, L LESSIN, 2001). O CD20 é uma molécula envolvida na ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B, sendo expressa por linfócitos pré-B e linfócitos B maduros, mas não por plasmócitos. O rituximabe apresenta melhor resposta naqueles pacientes com autoanticorpos em títulos elevados e sua eficácia comprova o importante papel das células B na fisiopatologia da doença (TAVAKOLPOUR *et al.*, 2019).

Já o abatacepte, que consiste em uma proteína de fusão solúvel composta por uma molécula do antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4, do inglês *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) associado a uma porção Fc da imunoglobulina G1, atua inibindo a coestimulação de células T. Para que ocorra a ativação de células T durante a apresentação de antígenos por células APCs, são necessários passos adicionais além da apresentação do antígeno através da molécula HLA de classe II, conhecidos como



coestimulação. Dentre estas etapas necessárias, está a interação entre a molécula CD86 presente em células APCs e a molécula CD28 presente em linfócitos T. A molécula CTLA-4, por ter uma afinidade maior ao CD86, atua como um ligante antagonista do CD28, interferindo na ativação dos linfócitos T (ROWSHANRAVAN; HALLIDAY; SANSOM, 2018).

O bloqueio da IL-6 também se mostrou uma estratégia bastante efetiva no tratamento da AR. O tocilizumabe, anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor da IL-6, tem uma eficácia semelhante aos anti-TNF no tratamento da AR, com a vantagem de ser o único biológico aprovado para uso em monoterapia (todos os demais devem ser utilizados em associação com uma DMCDs sempre que possível) (FINZEL *et al.*, 2019; SCOTT, 2017).

Nos últimos 10 anos aprofundou-se o conhecimento sobre os mecanismos de sinalização intracelular, sendo desenvolvidas pequenas moléculas capazes de bloquear as vias de transdução do sinal de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas são classificadas de acordo com a estrutura e função de seus receptores, sendo de particular interesse para o tratamento das doenças reumáticas autoimunes as citocinas tipo I e tipo II, que utilizam o sistema JAK-STAT para gerar a resposta pró-inflamatória. O domínio citoplasmático desses receptores transmembrana está associado a moléculas JAK (Janus kinases), que têm localização intracelular. Os quatro tipos de JAK (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2) se organizam em diferentes combinações de acordo com o tipo de receptor. Ao ser ativado pela ligação com sua citocina específica, o receptor sofre dimerização, o que aproxima as moléculas JAK entre si. Com a aproximação, as moléculas fosforilam resíduos de tirosina (processo chamado transfosforilação), com subsequente fosforilação de moléculas STAT (do inglês *signal transducer and activator of transcription proteins*) presentes livres no citoplasma, que migram para o núcleo e induzem a transcrição dos genes alvos (LEONARD, 2001; SCHWARTZ *et al.*, 2015; WINTHROP, 2017).

O primeiro inibidor de JAK liberado para uso na AR foi o tofacitinibe, que inibe preferencialmente a JAK1 e JAK3 (FLEISCHMANN *et al.*, 2017; VAN DER HEIJDE *et al.*, 2019). Posteriormente, foi aprovado o baricitinibe, inibidor da JAK1 e JAK2 (TAYLOR *et al.*, 2017) e, mais recentemente, o upadacitinibe, um inibidor preferencial da JAK1 (FLEISCHMANN *et al.*, 2019). Essas medicações possuem importantes vantagens quando comparadas às outras DMCDs. Em primeiro lugar, inibem simultaneamente as vias de sinalização de mais de uma citocina (ex: JAK1 contribui

na sinalização dos receptores da IL-2, IL-6, IL-7, IL-21, CG-CSF, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ). Segundo, por serem pequenas moléculas, podem ser armazenadas em temperatura ambiente, administradas via oral e possuem menor custo de produção quanto comparadas às medicações biológicas. Terceiro, podem ser usadas em monoterapia, uma vez que não ocorre a formação de anticorpos antidrogas. Por fim, estudos *head-to-head* sugerem que os inibidores da JAK são superiores aos DMCDsc e biológicos em monoterapia (FLEISCHMANN *et al.*, 2019; TAYLOR *et al.*, 2017). No presente momento, o que limita o uso mais abrangente é o preço de venda ainda elevado e efeitos colaterais a longo prazo ainda incertos, uma vez que o sistema JAK-STAT, além de citocinas inflamatórias, participa também da sinalização de diversos hormônios e fatores de crescimento (WINTHROP, 2017). Adicionalmente, apresentam maior risco cardiovascular e neoplásico, devendo ser utilizados com cautela em populações de risco (YTTERBERG *et al.*, 2022).

### **1.1.5 Impacto social e econômico**

Por se tratar de uma doença inflamatória crônica e sem cura, a AR está associada a elevados custos diretos (tratamento medicamentoso, exames complementares, internações e atendimentos em pronto-socorro) e indiretos (absentismo, presenteísmo, incapacidade e aposentadoria precoce) (HSIEH *et al.*, 2020). Apesar do significativo avanço nas opções terapêuticas, o MTX permanece como a primeira opção para o tratamento da AR tanto no Brasil quanto no restante do mundo (CONITEC, 2019; FRAENKEL *et al.*, 2021; SMOLEN *et al.*, 2020). Seu baixo custo, segurança e relativa eficácia certamente contribuem para que o MTX permaneça como pedra angular no tratamento da AR. Apesar de ser a primeira escolha, mais da metade dos pacientes apresenta resposta insatisfatória, sendo necessária a associação ou troca de medicamento, o que acarreta considerável atraso no controle da doença, necessidade de glicocorticoides por tempo prolongado e maior morbidade (DAVEAU *et al.*, 2009).

Com o advento das novas terapias, houve uma redução gradual nos custos indiretos, porém esta economia foi superada pelo aumento considerável nos gastos diretos associados ao tratamento medicamentoso. Uma meta-análise estima um custo anual direto de \$36.053,00 por paciente americano em uso de terapia biológica e

custos totais anuais podendo chegar a \$67.306,00 (HRESKO; LIN; SOLOMON, 2018). Já no Brasil, entre 2012 e 2017, o governo gastou R\$1,6 bilhão em medicamentos biológicos para o tratamento da AR. Aproximadamente 40% do orçamento destinado à assistência farmacêutica no SUS (Sistema Único de Saúde) acaba sendo utilizada para custear mediações biológicas, sendo a AR o diagnóstico mais prevalente (MEGA, 2019).

Dessa forma, novas tecnologias são urgentemente necessárias para a personalização terapêutica da AR, visando não apenas uma terapia guiada e consequente remissão da doença em um intervalo de tempo mais curto, mas também otimizar o uso de DMCDsc na AR, uma vez que as outras opções terapêuticas apresentam um elevado custo e não são isentas de eventos adversos graves (BUCH; EYRE; MCGONAGLE, 2021; SMOLEN *et al.*, 2020).

## 1.2 CÉLULAS T REGULADORAS

O organismo saudável funciona por meio de forças agonistas, antagonistas e regulatórias, promovendo um equilíbrio fisiológico onde as células funcionam em harmonia e combatem agentes estressores de forma ordenada. Com o sistema imunológico não poderia ser diferente. Da mesma forma que existem células capazes de gerar respostas inflamatórias capazes de combater microrganismos intracelulares (células T auxiliares tipo 1 – Th1), infecções parasitárias (células T auxiliares tipo 2 – Th2), patógenos extracelulares (células T auxiliares tipo 1 – Th17) e células tumorais (células T auxiliares tipo 9 – Th9), existem também grupos celulares responsáveis por regular e impedir uma resposta inflamatória exacerbada (DONG, 2021; SHEVYREV; TERESHCHENKO, 2020).

Em 1995, Sakaguchi e colaboradores identificaram em camundongos um subgrupo de células T capazes de suprimir resposta inflamatória autoimune, caracterizadas fenotipicamente pela expressão de CD4 (CD4+) e alta expressão do receptor de IL-2, o CD25 (CD25<sup>hi</sup>). A depleção dessas células foi capaz gerar diversas manifestações autoimunes em modelo murino (glomerulonefrite, tireoidite, sialoadenite, poliartrite e doença do enxerto versus hospedeiro), enquanto que a restituição das células CD4+CD25<sup>hi</sup> levou à reversão da resposta autoimune de modo

dose dependente, sendo por isso denominadas células T reguladoras (Treg) (SAKAGUCHI *et al.*, 1995).

Em seguida, foi identificado um fator de transcrição da família forkhead/winged-helix, denominado FoxP3, responsável por reprimir a hiperativação de linfócitos T em camundongos. Mutações no gene deste fator de transcrição gera uma doença recessiva ligada ao X altamente letal (conhecida como *Scurfy mice*), com infiltrado inflamatório difuso em diversos órgãos (BRUNKOW *et al.*, 2001). O gene FoxP3 também está presente em humanos e sua mutação causa a síndrome IPEX (equivalente humano do *Scurfy mice*), assim denominada pelo acrônimo em inglês de suas manifestações clínicas: desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia, síndrome ligada ao X (BENNETT *et al.*, 2001). Hoje está claro que FoxP3 é o principal gene regulador das funções supressoras das Treg, embora possa também ser transitoriamente expresso por outras células (WANG *et al.*, 2007).

### 1.2.1 Classificação das Treg

As Treg são classificadas em dois grupos principais de acordo com a sua origem: Treg derivadas do timo (tTreg), também conhecidas como Treg naturais (nTreg), e Treg induzidas (iTreg), também conhecidas como Treg periféricas (pTregs) (SAKAGUCHI *et al.*, 2008).

No timo, as células T que possuem receptores de células T (TCRs, do inglês *T-cell receptors*) com maior afinidade para moléculas MHC e autopeptídeos são recrutadas por meio do processo de seleção tímica. Ocorre então uma intensa interação entre essas células T e autopeptídeos de células estromais do timo, contribuindo para a seleção negativa de células T. Por fim, a expressão de FOXP3, presente construtivamente nestas células, estabiliza e sustenta o fenótipo regulatório. Estas células representam cerca de 5% das células T CD4+, estando presente tanto no sangue quanto nos linfonodos (JORDAN *et al.*, 2001; KOONPAEW *et al.*, 2006).

Adicionalmente, as Treg podem ser induzidas periféricamente (iTreg) por meio do estímulo de células T CD4+ com TFG- $\beta$  e IL-2 (ZHENG *et al.*, 2007). Estas células passam a expressar FoxP3 e possuem capacidade supressora, porém são menos estáveis que as tTreg. Geralmente ocorrem em tecidos com função de barreira (ex: pele, intestino e vias aéreas) e contribuem para regular a resposta inflamatória

induzida por antígenos exógenos. Curiosamente, tTreg e iTreg apresentam um repertório de TCRs que não se sobrepõe, sendo que o repertório TCR das tTreg reconhecem prioritariamente autoantígenos, enquanto das iTreg reconhecem antígenos externos (PACHOLCZYK *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Mecanismos imunossupressivos

As Treg podem exercer sua função supressiva tanto por meio de contato celular quanto por mecanismos humorais. Além disso, a resposta gerada pode ser específica para um certo antígeno ou não específica. Dentre os mecanismos humorais não específicos, destaca-se a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, IL-35 e TGF- $\beta$ . A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por células T efectoras (Th1, Th2 e Th17) e células NK (do inglês *natural killer*), induz anergia de células T citotóxicas, inibe a apresentação de antígenos por células APC (reduz a expressão de moléculas HLA classe II e a coestimulação via CD28) e reduz a ativação de macrófagos (MANNINO *et al.*, 2015). Já o TGF- $\beta$  tem uma potente ação antiproliferativa e inibe a diferenciação de diversas células do sistema imunológico (MORIKAWA; DERYNCK; MIYAZONO, 2016; YANG, L.; PANG; MOSES, 2010).

Por terem uma alta expressão de CD25 (receptor da IL-2), as Treg induzem uma deficiência desta citocina no microambiente, com conseqüente redução da replicação de células T CD8+ e, em menor intensidade, de células T CD4+ (CHINEN *et al.*, 2016). Adicionalmente, as Treg possuem em sua superfície uma elevada expressão das ectoenzimas CD39 e CD73, que são responsáveis pela defosforilação sequencial do ATP (uma potente alarmina quando localizada no espaço extracelular) em adenosina (molécula imunossupressora) (ERNST; GARRISON; THOMPSON, 2010). Além disso, expressam ao mesmo tempo PD-1 (do inglês *programmed cell death protein 1*) e o PD-1L (ligante do PD-1). O PD-1 presente nas Treg interage com o PD-1L presente em células dendríticas (CD) e induz um perfil tolerogênico, enquanto o PD-1L interage com o PD-1 das células T efectoras, induzindo um estado anérgico (GIANCHECCHI; FIERABRACCI, 2018).

Os TCRs presentes nas Treg podem reconhecer antígenos apresentados por células dendríticas (CDs) e inibir sua atividade, gerando uma supressão antígeno-específico por meio da remoção do complexo antígeno-MHC classe II das CDs por

transendocitose. Além disso, as Treg apresentam elevada expressão de CTLA-4, potente inibidor da coestimulação de células T via bloqueio do CD80/86 em CDs (AKKAYA *et al.*, 2019).

Curiosamente, as Treg podem passar a expressar fatores de transcrição relacionados ao perfil de células T que estão regulando. Assim, expressam T-bet quando inibindo células Th1, IRF-4 quando inibindo células Th2 e STAT3 quando inibindo células Th17. Este ajuste transcriptômico está relacionado ao perfil de citocinas no *milieu* inflamatório em que as células estão envolvidas e ocorre ao custo de maior instabilidade da expressão do gene FoxP3 (CHAUDHRY *et al.*, 2009; LEVINE *et al.*, 2017).

### 1.2.2 Treg e autoimunidade

Autoimunidade ocorre quando células do sistema imune passam a reconhecer componentes naturais do organismo como estranhos, gerando uma resposta aberrante de células B e células T, sendo uma importante característica o desenvolvimento de autoanticorpos (anticorpos direcionados contra epítopos endógenos). As doenças autoimunes são altamente prevalentes, afetando 3-5% da população geral, e podem ser órgão específicas, como a tireoidite de Hashimoto, ou afetar diversos órgãos e sistemas, como o lúpus eritematoso sistêmico (COOPER; BYNUM; SOMERS, 2009; DAVIDSON; DIAMOND, 2001). Acredita-se que o fenômeno autoimune inicial possa ocorrer por uma falha nos mecanismos normais de tolerância, apesar de ainda não estar claro se os estados fisiológicos de tolerância dependem prioritariamente da ausência de células autorreativas ou da supressão ativa por células supressoras antígeno-específicas (SHANAJ; DONLIN, 2019; VAN DE SANDE; BAETEN, 2016).

As Treg são cruciais para evitar a autoimunidade ao modular a função dos linfócitos por meio de mecanismos humorais e contato celular direto. Mutações no gene FOXP3 (principal responsável pela função regulatória das Treg) estão associadas a diversas manifestações autoimunes em camundongos (*scurfy mice*) e humanos (síndrome IPEX) (BENNETT *et al.*, 2001; BRUNKOW *et al.*, 2001). Além disso, disfunção das Treg está associada à fisiopatologia de diversas doenças autoimunes, como AR (JIANG *et al.*, 2021), lúpus eritematoso sistêmico (BONELLI;

SMOLEN; SCHEINECKER, 2010), psoríase (NUSSBAUM; CHEN; OGG, 2021), espondilite anquilosante (LAI *et al.*, 2019), esclerose múltipla e miastenia gravis (DANIKOWSKI; JAYARAMAN; PRABHAKAR, 2017). É possível que polimorfismos em certos genes, como Ctl4, Il2, Cd25 e Ptpn22 interfiram na função das Treg, contribuindo para o desenvolvimento dessas doenças.

No contexto da AR, a literatura apresenta resultados conflitantes quanto à proporção das Treg no sangue periférico. Há publicações que sugerem que estão aumentadas (HAN *et al.*, 2008; NIU *et al.*, 2012), inalteradas (LIU *et al.*, 2005; MÖTTÖNEN *et al.*, 2005) e reduzidas (CAO *et al.*, 2004; KAWASHIRI *et al.*, 2011; SAMSON *et al.*, 2012). Esta heterogeneidade dos resultados pode ser parcialmente explicada pela diversidade de protocolos utilizados para isolamento do PBMC e diferentes marcadores utilizados para definir a população de Treg (CD4+CD25<sup>hi</sup> vs CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> vs CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3+). Por outro lado, os trabalhos são consistentes em demonstrar um aumento das Treg no líquido sinovial, com capacidade supressora preservada *in vitro*, mas não *in vivo*. Acredita-se que o microambiente inflamatório (especialmente a presença de IL-6) seja responsável pela disfunção das Treg na sinóvia reumatoide, sendo inclusive capaz de converter Treg em células Th-17 (KIMURA; KISHIMOTO, 2010; SAMSON *et al.*, 2012).

A infusão e modulação das Treg tem um potencial terapêutico promissor nas doenças autoimunes. A depleção de células CD25+ piora significativamente a artrite em camundongos com artrite induzida por colágeno (modelo CIA, do inglês *Collagen-induced arthritis*), enquanto a infusão de células CD4+CD25+ previne o desenvolvimento da doença (MORGAN *et al.*, 2003, 2005). Estudos em pacientes com diabetes tipo 1 (DM1) demonstram que a infusão de Treg policlonais autólogas é bastante segura e está associada a melhora significativa da doença, porém após 3 meses de tratamento a maioria das células infundidas são indetectáveis no sangue periférico (BLUESTONE *et al.*, 2015).

O CD25 (receptor da IL-2), além de altamente expresso nas Treg, tem uma elevada sensibilidade neste grupo celular quando comparado às demais células T. A administração de baixas doses de IL-2, citocina fundamental para estabilidade e função das células T reguladoras, se mostrou segura em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e foi eficaz em expandir as Treg (VON SPEE-MAYER *et al.*, 2016). Em uma tentativa de aumentar a sobrevivência das células implantadas, a transfusão de Treg foi associada ao tratamento com baixas doses de IL-2 em pacientes

com DM1. Apesar do aumento do número e sobrevivência das Treg implantadas, houve também uma expansão de células NK e CD8+ (DONG, S. *et al.*, 2021). O impacto deste efeito em outros grupos celulares ainda precisa ser determinado no contexto de outras doenças autoimunes, com a AR.

Um método mais elegante de modulação das Treg consiste na infusão de CDs tolerogênicas diferenciadas *ex vivo* a partir do PBMC estimulado com IL-4, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte–macrophage colony-stimulating factor*), inibidor de NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) e peptídeos citrulinados. CDs LY75+ (receptor responsável pela captação e processamento de antígenos) são capazes de apresentar antígenos cognatos a células T CD4+ naïve, induzindo-as a se diferenciarem em Treg (FEUERER *et al.*, 2010). Um estudo piloto com 18 pacientes com AR demonstrou que a injeção intradérmica de CDs autólogas sensibilizadas com peptídeos citrulinados foi capaz de aumentar a proporção de Treg no sangue periférico, reduzir citocinas pró-inflamatórias circulantes e reduzir atividade da doença (BENHAM *et al.*, 2015).

A terapia com células T geneticamente modificadas com receptores de antígeno quiméricos (CAR-T *cells*, do inglês *chimeric antigen receptor T*) já está bem consolidada na oncologia, porém ainda em fase de desenvolvimento no tratamento das doenças autoimunes. CAR são compostos sintéticos formados, na porção extracelular, por um fragmento variável de um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer um alvo específico, e, na porção intracelular, por diversas moléculas de sinalização responsáveis pela ativação de células T. O uso de células CAR-T possui a importante vantagem de gerar uma vigorosa e duradoura resposta de células T contra células específicas de modo independente do sistema MHC (STERNER; STERNER, 2021). De forma análoga, Treg antígeno-específicas (células CAR-Treg) poderiam ser criadas e utilizadas na supressão da resposta autoimune contra um antígeno específico (SHARABI *et al.*, 2018). Diferentemente das Treg convencionais (TCR-Treg), CAR-Treg funcionam de modo independente do sistema MHC, são menos dependentes de IL-2, possuem maior estabilidade do fenótipo regulador e possuem maior capacidade supressora (ARJOMANDNEJAD; KOPEC; KEELER, 2022). Estudos clínicos e de bioengenharia ainda são necessários para confirmar a aplicabilidade das CAR-Treg no tratamento de doenças autoimunes.

Em resumo, estratégias farmacológicas que reforçam e restabelecem a função supressora de Treg estão em processo de validação clínica e podem contribuir para o



avanço no arsenal terapêutico para o tratamento da AR (DUGGLEBY *et al.*, 2018; GLIWIŃSKI *et al.*, 2019; WU, R. *et al.*, 2020). A transfusão de Treg policlonais e uso de células CAR-Treg, apesar de promissor, apresentam o elevado custo como importante fator limitante (SHARABI *et al.*, 2018).

### **1.3 METOTREXATO**

Apesar de ainda hoje ser considerada a pedra angular no tratamento da AR e peça fundamental no tratamento de diversas outras doenças autoimunes, o MTX é uma droga cuja história remete à década de 1940. Em 1948, Farber e colaboradores demonstraram que a aminopterina, droga com propriedades anti-folato, apresentava ação antineoplásica em pacientes com leucemia (FARBER *et al.*, 1948). Em 1951, Gubner e colaboradores testaram esta medicação em pacientes com AR, obtendo uma boa resposta (GUBNER; AUGUST; GINSBERG, 1951). Por se tratar de uma droga de estrutura complexa e difícil fabricação, foi então desenvolvida uma medicação sintética de estrutura mais simples e com capacidade antiproliferativa semelhante, o MTX. Nas décadas de 1960 e 1970 foram publicadas séries de casos demonstrando boa resposta do metotrexato em pacientes com AR e artrite psoriásica, inclusive quando utilizado em baixas doses (BLACK *et al.*, 1964; HOFFMEISTER, 1983). Infelizmente, o uso de uma medicação antineoplásica no tratamento de doenças reumáticas não obteve ampla aceitação inicial, sendo apenas na década de 1980 que seu uso passou a ser rotineiro na reumatologia (WEINBLATT, 2013).

#### **1.3.1 Farmacocinética e farmacodinâmica**

No tratamento da AR, o MTX é utilizado na dose de 15 a 25 mg uma vez por semana, administrado por via oral (mais utilizada na prática) ou subcutânea. Após a administração oral, a droga é rapidamente absorvida na porção proximal do intestino delgado, com uma biodisponibilidade usualmente superior a 70%. Doses superiores a 15mg estão sujeitas a maior oscilação da biodisponibilidade, provavelmente relacionado à saturação dos carreadores. O pico de concentração plasmática ocorre 2h após a ingestão oral e se torna indetectável após 24h (INOUE; YUASA, 2014).

O MTX é um constructo xenobiótico que mimetiza o ácido fólico e, de forma geral, utiliza os mesmos transportadores e carreadores. Dessa forma, é absorvido no intestino pelo transportador de folato acoplado a próton (PCFT do inglês *proton-coupled folate transporter*) e transportado para o espaço intracelular pelo carreador reduzido de folato 1 (RFC1, do inglês *reduced folate carrier 1*) (MIKKELSEN *et al.*, 2011).

Esta droga tem a capacidade de se difundir rapidamente nos líquidos e tecidos, atingindo concentrações no líquido sinovial similares às concentrações plasmáticas. Uma vez no espaço intracelular, o MTX monoglutamato (forma nativa da droga) é rapidamente convertido em metotrexato poliglutamato (MTX<sub>glu</sub>) pela enzima folilpoliglutamato sintase, que adiciona até 5 resíduos de glutamato à molécula original. O MTX<sub>glu</sub> é a forma ativa da droga e o processo de poliglutamação estende a sua meia-vida em várias semanas (KREMER *et al.*, 1986).

Mais de 80% do MTX é excretado inalterado na urina via filtração glomerular e secreção ativa mediada por diversos transportadores, tais como SLC22A6, SLC22A8, ABCG2 e ABCC2. O restante é metabolizado no fígado em 7-hidroximetotrexato ou degradado por bactérias intestinais (VLAMING *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Mecanismo de ação

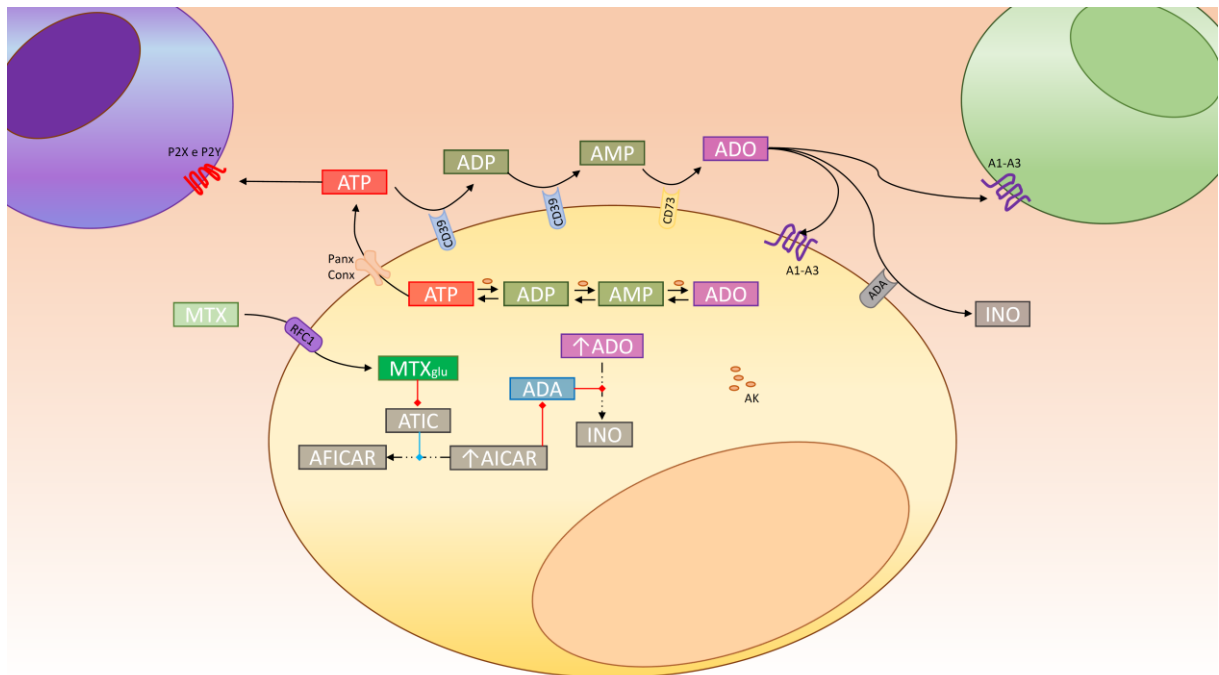
O MTX é uma molécula sintética análoga ao ácido fólico desenvolvida com o objetivo de tratar doenças linfoproliferativas via inibição da dihidrofolato redutase (enzima essencial para a síntese de purinas e pirimidinas) através da produção de folatos reduzidos. Assim, quando utilizado em altas doses, o MTX reduz a taxa de replicação celular ao bloquear a síntese de DNA e RNA (GOLDMAN; MATHERLY, 1985).

Curiosamente, no contexto do tratamento da AR, o MTX é eficaz em doses bem inferiores às utilizadas no tratamento de neoplasias (15-25mg/semana versus 2,7g/m<sup>2</sup> em 24h, respectivamente) (LEE, E. J. *et al.*, 2001). Além disso, a reposição diária do ácido fólico (exceto nos dias de uso MTX) reduz consideravelmente os efeitos adversos hipoproliferativos (leucopenia, alopecia e mucosite), mas não reduz eficácia da medicação na AR, sugerindo que a ação antiproliferativa não deva ser o principal mecanismo imunossupressor no tratamento desta doença. Vale ressaltar, contudo,

que quando utilizado no mesmo dia que o MTX, o ácido fólico pode reduzir resposta terapêutica ao competir com os transportadores nos enterócitos e reduzir absorção intestinal do MTX (WHITTLE; HUGHES, 2004).

Atualmente, acredita-se que o principal mecanismo de ação do MTX em baixas doses seja através do aumento dos níveis extracelulares de adenosina (ADO), uma importante molécula anti-inflamatória (CRONSTEIN; AUNE, 2020). No citoplasma, o MTX é convertido em MTX<sub>glu</sub>, que por sua vez é capaz de inibir a enzima ATIC (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo formiltransferase). O bloqueio desta enzima leva a um aumento dos níveis intracelulares de AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo), substância capaz de bloquear a ação da adenosina deaminase (ADA), enzima que degrada a adenosina em inosina (BAGGOTT; VAUGHN; HUDSON, 1986). Dessa forma, o MTX gera um aumento dos níveis intracelulares de adenosina, que pode ser transportada para o espaço extracelular ou, mais comumente, fosforilada pela adenosina quinase (AK) em ATP, que por sua vez é transportado para o espaço extracelular pelo transportador purinérgico transmembrana. As ectoenzimas CD39 (ectonucleoside trifosfato difosfo-hidrolase 1, E-NTPDase1) e CD73 (ecto5'-nucleotidase, Ecto5'NTase) realizam a defosforilação sequencial do ATP, molécula pró-inflamatória quando localizada no espaço extracelular, em adenosina, que possui ação anti-inflamatória (RAVANI *et al.*, 2017; VARANI *et al.*, 2011; VINCENZI *et al.*, 2013). A **Figura 2** representa o mecanismo de ação do MTX em baixas doses e sua influência no sistema purinérgico.

**Figura 2 - Mecanismo de ação do MTX através da modulação do sistema purinérgico.**



A1-A3: receptores de adenosina (A1, A2A, A2B, A3); ADA, adenosina deaminase; ADO: adenosina; ADP: difosfato de adenosina; AMP: monofosfato de adenosina; AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo; AK, adenosina quinase; ATIC: AICAR transformilase; ATP: trifosfato de adenosina; CD39: ATP difosfohidrolase; CD73: ecto-5' nucleotidase; INO: inosina; MTX: metotrexato; MTX<sub>glu</sub>: metotrexato poliglutamato; P2X e P2Y: receptores purinérgicos que reconhecem ATP; Panx: Panexinas; Conx: Conexinas; RFC1: transportador transmembranar bidirecional de folato; linha azul: ação agonística; linha vermelha: ação antagonística.

### 1.3.3 O binômio ATP-adenosina e a resposta inflamatória

O sistema purinérgico é essencial para a sobrevivência e participa praticamente de todos os processos biológicos. Purinas são formadas por moléculas aromáticas heterocíclicas e sua origem remete aos mares primitivos da era prebiótica, contribuindo diretamente para o surgimento da vida (MILLER; UREY, 1959). O ATP é a principal molécula energética, fundamental para a proliferação, migração, metabolismo e apoptose celular. Em condições fisiológicas, existe em altas concentrações no espaço intracelular (5-8 mM), porém em concentrações extremamente baixas no extracelular (400-1000 nM) (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012).

O ATP consiste em uma molécula de adenosina (ou seja, adenina associada a ribose) ligada a três grupos de fosfato. Esta molécula funciona como uma reserva de

energia, sendo produzida por meio da respiração celular (catabolismo da glicose em condições aeróbicas), beta-oxidação (catabolismo de ácidos graxos), cetose (catabolismo de corpos cetônicos) e respiração anaeróbia (catabolismo da glicose em condições anaeróbicas). O poder energético desta molécula vem das ligações fosfodiéster (as cargas eletronegativas associadas geram uma grande força de repulsão) que conectam os grupos fosfato. Dessa forma, quando o ATP é hidrolisado em difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina, ocorre liberação de grande quantidade de energia (BONORA *et al.*, 2012; MEURER *et al.*, 2017)

Apesar de essencial para o metabolismo energético no espaço intracelular, o ATP desencadeia uma potente resposta inflamatória quando liberado no espaço extracelular, uma vez que atua como DAMP (do inglês *damage-associated molecular patterns*) através da interação com receptores os receptores purinérgicos P2X e P2Y. Os níveis de ATP podem ser elevados em várias vezes no espaço extracelular durante condições inflamatórias, tais como isquemia, trauma, infecção, hipóxia e necrose celular. Esta liberação de ATP (e outras purinas) pode ocorrer de modo descontrolado, como na isquemia e trauma, ou de modo coordenado por células inflamatórias através de panexinas e conexinas (transportadores transmembrana) (IDZKO; FERRARI; ELTZSCHIG, 2014).

Um importante mecanismo compensatório da resposta inflamatória desencadeada pelo ATP é a hidrólise sequencial realizada por ectoenzimas. Neste processo, cada grupo fosfato é removido sequencialmente, gerando ADP, AMP e, por fim, adenosina. A enzima CD39 (ENTPD1, do inglês *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1*) defosforila o ATP em ADP, e este último em AMP, enquanto a enzima CD73 (ecto-5'-nucleotidase) defosforila AMP em adenosina (JUNGER, 2011). A CD73 é presente na superfície de diversos grupos celulares e pode ser encontrada também na forma solúvel, enquanto a CD39 tem uma expressão mais restrita, sendo particularmente expressa em altas concentrações em células T reguladoras (LUCA ANTONIOLI, PAL PACHER, E. SYLVESTER VIZI, 2013; PERES *et al.*, 2015).

A adenosina, ao contrário do ATP, é uma molécula de ação imunossupressora e anti-inflamatória. Age de modo autócrino e parácrino, uma vez que possui meia-vida extremamente curta (cerca de 6 segundos). Ao atuar por meio de quatro receptores acoplados a proteína G (A1, A2a, A2b e A3), a adenosina interfere na expressão intracelular de AMPc (adenosina 3,5-monofosfato cíclico), importante molécula

transdutora de sinal, exercendo importante papel regulador na função de células inflamatória (HASKÓ *et al.*, 2008). Nos neutrófilos, a adenosina inibe quimiotaxia, produção de radicais livres e produção de NETs, enquanto nos macrófagos promove transição do perfil M1 (inflamatório) para o perfil M2 (pró-resolutivo), inibe produção de citocinas pró-inflamatórias e formação de osteoclastos. Já nas células T, inibe ativação via TCR e redireciona células T pró-inflamatórias para um fenótipo imunossupressor (CRONSTEIN; SITKOVSKY, 2017). Adicionalmente, a adenosina possui importante papel limitando o dano tecidual no contexto de isquemia e hipóxia (ação vasodilatadora e antitrombótica), reduz dor neuropática e possui propriedades anticonvulsivantes ao modular a atividade cerebral, fazendo desta molécula ubíqua uma importante peça para a manutenção da homeostase (BOREA *et al.*, 2016).

#### **1.3.4 Resistência ao tratamento com metotrexato**

Por muito tempo tem-se buscado uma medicina personalizada no tratamento da AR (a maioria dos trabalhos focados no tratamento com MTX e anti-TNF), porém até o presente momento não existem biomarcadores de resposta terapêutica utilizados na prática clínica (BROWN; PRATT; ISAACS, 2016). Potenciais marcadores genéticos, como genes relacionados à absorção e metabolismo do MTX, apresentam resultados inconsistentes, possivelmente influenciados por variações genéticas entre diferentes grupos étnicos e interações gene-gene (LING; BLUETT; BARTON, 2018).

A utilização de escores compostos, como o MBDAS (do inglês *Multi-Biomarker Disease Activity Score*, Escore de Atividade de Doença de Múltiplos Biomarcadores), apesar de úteis para avaliação do prognóstico radiográfico, foram ineficazes na predição resposta ao tratamento com MTX (LUEDDERS *et al.*, 2020). Por outro lado, perfil histopatológico e transcriptômico do tecido sinovial parece influenciar na resposta terapêutica e prognóstico radiológico (pacientes com perfil pró-mieloide apresentam melhor resposta ao tratamento inicial), porém ainda não há resultados quanto à predição de terapias específicas (HUMBY *et al.*, 2019; LEWIS *et al.*, 2019).

A utilização clínica de um bom preditor de resposta terapêutica ao MTX potencialmente evitaria o uso desnecessário da medicação em cerca de 60% dos pacientes com AR, permitiria o início direto da leflunomida ou outra DMCD sintética

convencional, mitigaria o uso precipitado da terapia biológica em pacientes não respondedores ao MTX e obteria a remissão em intervalo de tempo mais curto.

### 1.3.5 CD39 como biomarcador de resposta ao MTX

Treg expressam altos níveis de CD39 e CD73, sendo a produção de adenosina um importante mecanismo supressor efetuado por estas células (KOBIE *et al.*, 2006). Treg provenientes de camundongos CD39<sup>-/-</sup> apresentam uma perda da sua propriedade supressiva *in vitro* e falham para bloquear a rejeição do aloenxerto *in vivo* (DEAGLIO *et al.*, 2007). Além disso, tumores ricos em Treg suprimem a resposta imune antitumoral de modo mais efetivo, conseqüente evoluindo com comportamento mais agressivo e maior mortalidade. Assim, o CD39 tem se mostrado um importante *check point* do sistema imunológico e antagonistas do CD39 estão em investigação para o tratamento de diversos tumores (NCT03884556, NCT04261075, NCT04336098)(MOESTA; LI; SMYTH, 2020).

Diante das evidências que o MTX atua principalmente através do aumento dos níveis de adenosina no espaço extracelular e que as Treg apresentam elevada expressão das ectoenzimas responsáveis pela conversão de ATP em adenosina, nosso grupo investigou o papel das Tregs na resposta terapêutica ao MTX. Peres e colaboradores demonstram que pacientes respondedores ao MTX apresentam elevada expressão de CD39 nas Treg isolados a partir do PBMC antes do início do tratamento quando comparados a não respondedores ao MTX e indivíduos saudáveis. O tratamento não interferiu na expressão do CD39 e a expressão do CD73 nas Treg não mostrou diferença entre os grupos analisados. Desta forma, este trabalho sugere que a análise da expressão do CD39 em Treg pode ser utilizada como biomarcador preditor de resposta terapêutica (PERES *et al.*, 2015). Este importante estudo gerou um depósito de patente no INPI para o desenvolvimento de um kit para identificação de resposta ao MTX na AR através da expressão do CD39 em células mononucleares do sangue periférico (INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Patente de Invenção, número do registro BR1020130109967, data de depósito 03/05/2013).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

O presente estudo tem como objetivo principal confirmar o papel do CD39 em células Treg humanas como biomarcador de resposta terapêutica ao metotrexato em pacientes com artrite reumatoide, otimizando e simplificando seu método de aferição.

### **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- 2.2.1** Avaliar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes com artrite reumatoide inicial atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto;
- 2.2.2** Determinar a taxa de resposta terapêutica ao metotrexato e incidência de eventos adversos;
- 2.2.3** Correlacionar níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias ao diagnóstico e a resposta terapêutica ao metotrexato;
- 2.2.4** Determinar a correlação entre variáveis secundárias (sexo, idade, tabagismo, atividade da doença e perfil de autoanticorpos) e o níveis de CD39 nas Treg;
- 2.2.5** Em um modelo experimental de artrite, avaliar o impacto da inflamação e dos tratamentos imunossupressores na dinâmica das células Treg circulantes e níveis séricos de citocinas inflamatórias.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa clínica foi realizada pela Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), coordenada pelo Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior. Os pacientes foram recrutados no Ambulatório de Artrite Reumatoide Inicial (REUC) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) conduzidos pelos reumatologistas Dr. Renê Donizeti de Oliveira e Dr. Sérgio Couto de Almeida. A análise laboratorial das amostras foi realizada no Laboratório de Imunologia da Divisão de Imunologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. A pesquisa foi conduzida de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMRP-USP (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética nº 89092417.3.0000.5440 e parecer nº 2.724.944) (**Anexo I**).

Os experimentos em animais foram realizados no Laboratório de Inflamação e Dor (LID) da FMRP-USP, coordenado pelo Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, e foram conduzidos de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP (número de protocolo 1003/2021).

#### 3.1. Recrutamento e estratificação dos pacientes

Entre janeiro de 2017 e setembro de 2019 foram, foram recrutados pacientes com diagnóstico recente de AR que preencheram os critérios classificatórios da *American College of Rheumatology / European Alliance of Associations for Rheumatology* (ACR/EULAR) estabelecidos em 2010 (**Anexo II**) (ALETAHA *et al.*, 2010).

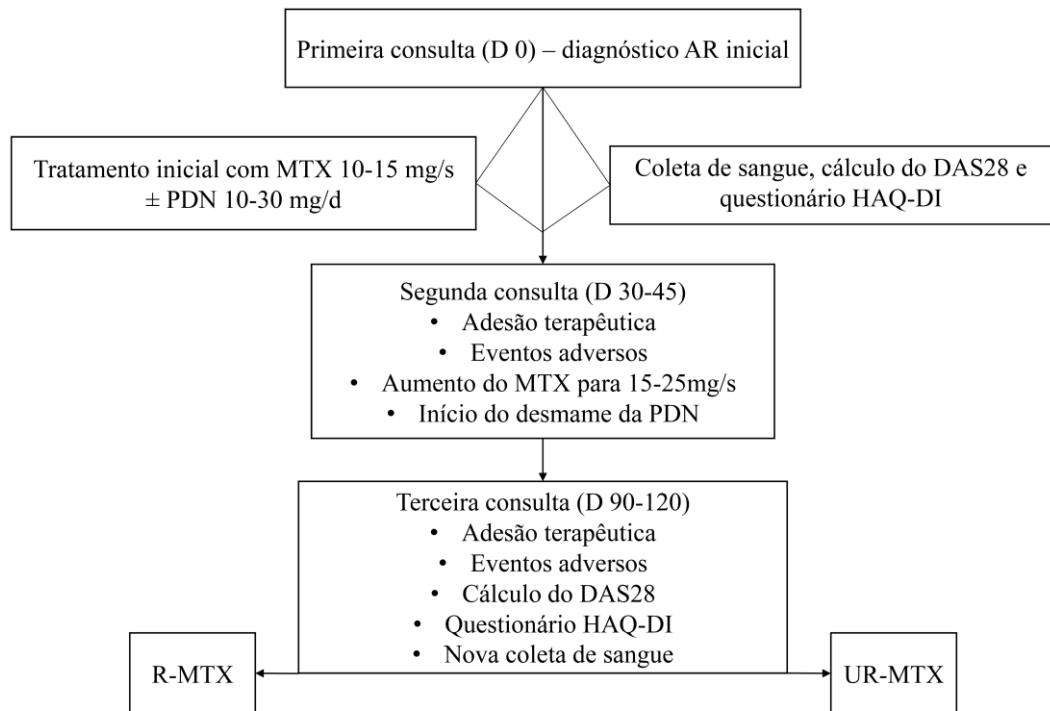
Foram considerados critérios de inclusão: início dos sintomas articulares há 24 meses ou menos, ausência de contraindicação para início de tratamento com metotrexato, Escore de Atividade da Doença - 28 articulações (DAS28, do inglês *Disease Activity Score 28 joints*) (**Anexo III**) maior que 3,2 na primeira avaliação (ALETAHA *et al.*, 2005; PINHEIRO, 2007; PREVOO *et al.*, 1995). Foram considerados critérios de exclusão: presença de doenças infecciosas, neoplásicas e outras doenças autoimunes, uso atual ou prévio de DMCDs e uso atual corticosteroides.

A avaliação clínica inicial foi constituída da anamnese e exame físico do aparelho osteoarticular realizados pelo reumatologista assistente, enquanto os exames complementares realizados foram hemograma completo, dosagem sérica FR, anti-CCP, proteína C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS), ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (TGO/AST) e alanina aminotransferase (TGP/ALT). Além disso, radiografias foram realizadas das articulações acometidas. Com o intuito de avaliar a limitação funcional causada pela doença e sua evolução com o tratamento, o questionário foi HAQ-DI (*Health Assessment Questionnaire - Disability Index*) foi aplicado (**Anexo IV**) (CORBACHO; DAPUETO, 2010; MASKA; ANDERSON; MICHAUD, 2011).

Após os critérios de inclusão terem sido preenchidos e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice I**) lido e assinado, todos os pacientes receberam tratamento inicial com MTX na dose de 7,5-15mg/semana (a depender do peso e idade), associado ou não à prednisona na dose de 10-30mg/dia (julgado pelo reumatologista assistente a depender da gravidade do quadro articular). Após 4-8 semanas de tratamento, os pacientes foram reavaliados quanto à adesão terapêutica, eventos adversos ao tratamento e atividade da doença. Quanto possível, a dose do metotrexato foi ajustada para 15-25mg/semana e realizado desmame da prednisona. Após 3-6 meses de tratamento, os pacientes foram julgados respondedores ou não respondedores ao MTX por um reumatologista assistente cego quanto à expressão de CD39.

Foram classificados como pacientes não responsivos ao MTX (MTX-NR) aqueles que utilizaram a medicação de forma regular na dose maior ou igual a 15 mg/semana por mais de três meses consecutivos e que ainda apresentaram doença em moderada ou alta atividade, definida pelo DAS28 maior que 3,2. Foram considerados responsivos (MTX-R) aqueles que atingiram um DAS28 menor ou igual a 3,2 após mais de três meses tratamento com MTX, queda do DAS28 maior ou igual a 1,2 e desmame completo da prednisona ou necessidade de dose igual ou inferior a 5mg/dia (**Figura 3**).

**Figura 3 - Organograma representativo do delineamento experimental.**



AR: artrite reumatoide; D: dia; HAQ-DI: *Health Assessment Questionnaire Disability Index*; MTX: metotrexato, DAS28: *Disease Activity Index 28 joints*; MTX-R: responsivos ao MTX, MTX-NR: não responsivos ao MTX, PDN: prednisona.

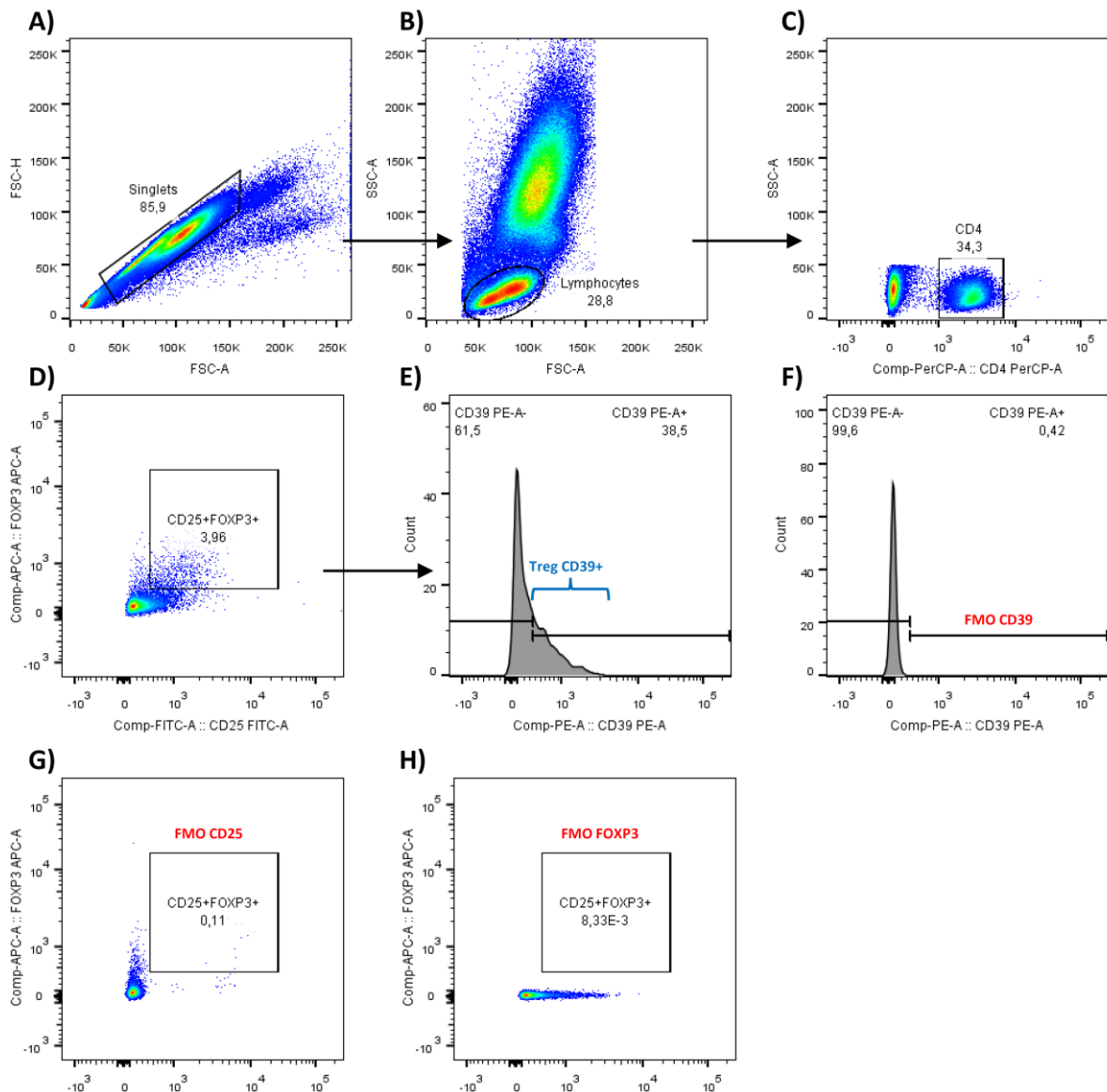
### 3.2. Separação de células e plasma

Após a coleta 15ml de sangue periférico por paciente em tubos contendo EDTA (Vacutainer, BD), os corpos celulares foram separados do plasma via centrifugação a 450g (força centrífuga relativa - RCF) por 10 minutos. O plasma foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futura dosagem de citocinas e quimiocinas. Metade dos corpos celulares foi utilizada para separar as células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) através de nova centrifugação (650xG por 30 minutos) em soluções de Percoll (Sigma®) com dois níveis de densidade (a 54% e 45%), enquanto a outra metade foi utilizada para separar os leucócitos do sangue total (ST) através da lise de hemácias utilizando tampão de lise convencional (bicarbonato de sódio 0,1M, cloreto de amônio 0,15M e EDTA 0,0001M, pH 7,4) por 10 minutos. A viabilidade das células foi checada pelo uso do corante Trypan Blue (Invitrogen) e contagem realizada na câmara de Neubauer sob microscopia ótica convencional.

### 3.3. Fenotipagem de linfócitos humanos por citometria de fluxo

Para a realização da citometria de fluxo, foram utilizadas 1 milhão de células do PBMC e do ST por análise, sempre em duplicata. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-CD4 conjugado a PERCP7 (ImmunoTools, 1:100), anti-CD25 conjugado a FITC (ImmunoTools, 1:25), anti-FoxP3 conjugado a Alexa Fluor 647 (BD, 1:20) e anti-CD39 conjugado a PE (BD, 1:25). As proteínas de superfície (CD4, CD25 e CD39) foram marcadas por 20 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Como FoxP3 é um fator de transcrição (localização intracelular), foi necessária permeabilização e fixação das células com o kit de marcação intracelular de FoxP3 (eBioscience) conforme orientações do fabricante. Após marcação, a leitura foi feita dentro de 48h utilizando o citômetro FACS Verse (BD). Após exclusão de células agregadas e células cujo tamanho e complexidade interna são incompatíveis com linfócitos, foi calculada a média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *Median Fluorescence Intensity*) de CD39 das células CD4+CD25+FoxP3+CD39+ (TregsCD39+). O resultado final da expressão de CD39 (MFI de CD39) de cada paciente é expressa pela razão com um mesmo indivíduo saudável utilizado como controle em todos os experimentos (MFI do paciente ÷ MFI do controle). As análises foram feitas utilizando os softwares BD FACSDiva™ and BD FlowJo™ (**Figura 4**).

Figura 4 – Dot plots representativos da estratégia de *gates* empregada a citometria de fluxo.



CD: cluster of differentiation; FSC-H: forward scatter-high; FSC-A: forward scatter-area; SSC-A: side scatter-area; FMO: Fluorescence Minus One. Treg: célula T reguladora

### 3.4 Dosagem de citocinas e quimiocinas

Citocinas e quimiocinas plasmáticas foram dosadas por meio do imunoensaio Luminex®, que utiliza microesferas magnéticas marcadas internamente com fluoróforos vermelhos e infravermelhos em diversas assinaturas espectrais, capazes de se ligar a citocinas e quimiocinas alvo por meio de reações antígeno-anticorpo. Através de um aparelho Luminex, cada esfera marcada é excitada por um laser vermelho, o que permite diferenciar até 100 analitos diferentes por amostra. Para a análise no plasma de pacientes e indivíduos controle, foi utilizada a placa

MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A de 42 analitos, enquanto para a análise do soro de camundongos foi utilizada a placa MILLIPLEX® MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel de 32 analitos (Millipore, Massachusetts, EUA).

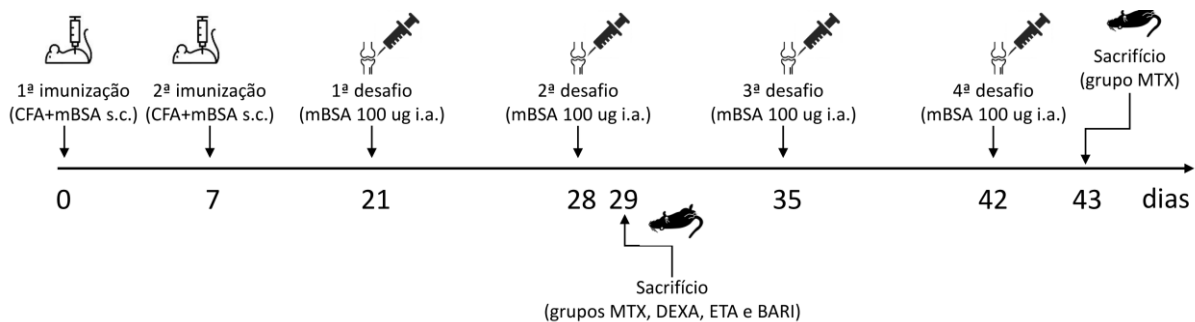
### 3.5 Modelo experimental de artrite

Foi utilizado Artrite Induzida por Antígeno (AIA) em camundongos como modelo animal de artrite inflamatória conforme previamente descrito (CHOUDHARY; BHATT; PRABHAVALKAR, 2018; PINTO *et al.*, 2015; SCHNEIDER *et al.*, 2021). Sumariamente, camundongos C57BL/6 WT machos de 6 semanas de idade pesando 20-25g foram imunizados com duas doses subcutâneas de albumina de soro bovino metilado (mBSA - 500 µg) diluído em 100µl solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e 100µl de adjuvante de Freund completo (CFA; 1 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*) no dia 0 (D0) e no dia 7 (D7) do experimento. Vinte e um dias após a primeira imunização (D21), artrite foi induzida no joelho direito de cada animal por meio da injeção intra-articular de 100 µg de mBSA diluído em 50 µl de solução fisiológica, administrado uma vez por semana por um total de 1 a 4 semanas a depender do tipo de tratamento avaliado (**Figura 5**). Os animais foram anestesiados com isoflurano 2% inalatório antes da realização de cada desafio. Neste modelo, artrite se inicia nas primeiras 24 horas após o primeiro desafio, evoluindo com dano articular mediado predominantemente por células T autorreativas, neutrófilos e macrófagos (BENDELE *et al.*, 1999; BRACKERTZ; MITCHELL; MACKAY, 1977).

Os camundongos foram tratados com 4 drogas diferentes: MTX, dexametasona, etanercepte (anti-TNF) e baricitinibe (inibidor da JAK). No grupo MTX, Tecnomet (Zodiac) foi administrado via gavem na dose de 2mg/kg/semana, iniciado 2 semanas antes da primeira imunização e realizado até o dia do sacrifício (PERES *et al.*, 2015). O grupo dexametasona foi tratado com Decadron (Ache) 1mg/kg/dia via intraperitoneal por 7 dias (YANG *et al.*, 2004), o grupo etanercepte foi tratado com Enbrel (Pfizer) 4mg/kg 2 vezes por semana por via subcutânea em um total de 4 doses (WU *et al.*, 2022) e o grupo baricitinibe foi tratado com Olumiant (Lilly) 5mg/kg/dia via gavagem diluído em 0,5% metil celulose por 7 dias (LEE *et al.*, 2021).

Cada grupo tratado foi comparado com mesmo número de camundongos artríticos tratado com placebo (diluyente da droga comparada administrado mesma via) e camundongos controle que foram imunizados de modo idêntico ao grupo artrítico, porém receberam desafio intra-articular apenas com diluyente (50 µl de solução fisiológica). Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram sacrificados por meio de overdose com cetamina e xilazina (AL-MOUSAWI *et al.*, 2010; CICERO *et al.*, 2018).

**Figura 5 - Modelo de Artrite Induzida por Antígeno (AIA) em camundongos.**

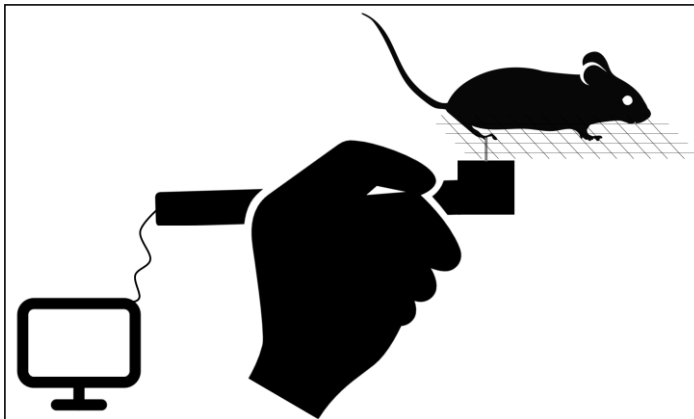


CFA: *Complete Freund's Adjuvant*, mBSA: albumina bovina sérica metilada, s.c.: subcutâneo, i.a.: intra-articular, MTX: metotrexato, DEXA: dexametasona, ETA: etanercepte, BARI: baricitinibe.

### 3.6 Avaliação de dor e edema articular em camundongos

A resposta terapêutica foi avaliada pela mensuração da dor e edema das articulações inflamadas conforme previamente descrito (SCHNEIDER *et al.*, 2021). Brevemente, a sensibilidade dolorosa foi aferida por meio do teste de von Frey eletrônico, que consiste na determinação do limiar de pressão aplicado perpendicularmente à pata do animal (sentido ífero superior) suficiente para que ocorra a retirada reflexa da pata (o limiar mecânico é expresso em gramas). O valor final é a média de duas aferições independentes após período mínimo de 1h de ambientação (**Figura 6**). O edema, por sua vez, foi medido por meio do uso de um paquímetro (unidade de medida expressa em milímetros) com o animal sedado com isoflurano inalatório a 2%.

**Figura 6 - Teste de von Frey eletrônico.**



### 3.7 Coleta de sangue e linfonodos dos camundongos

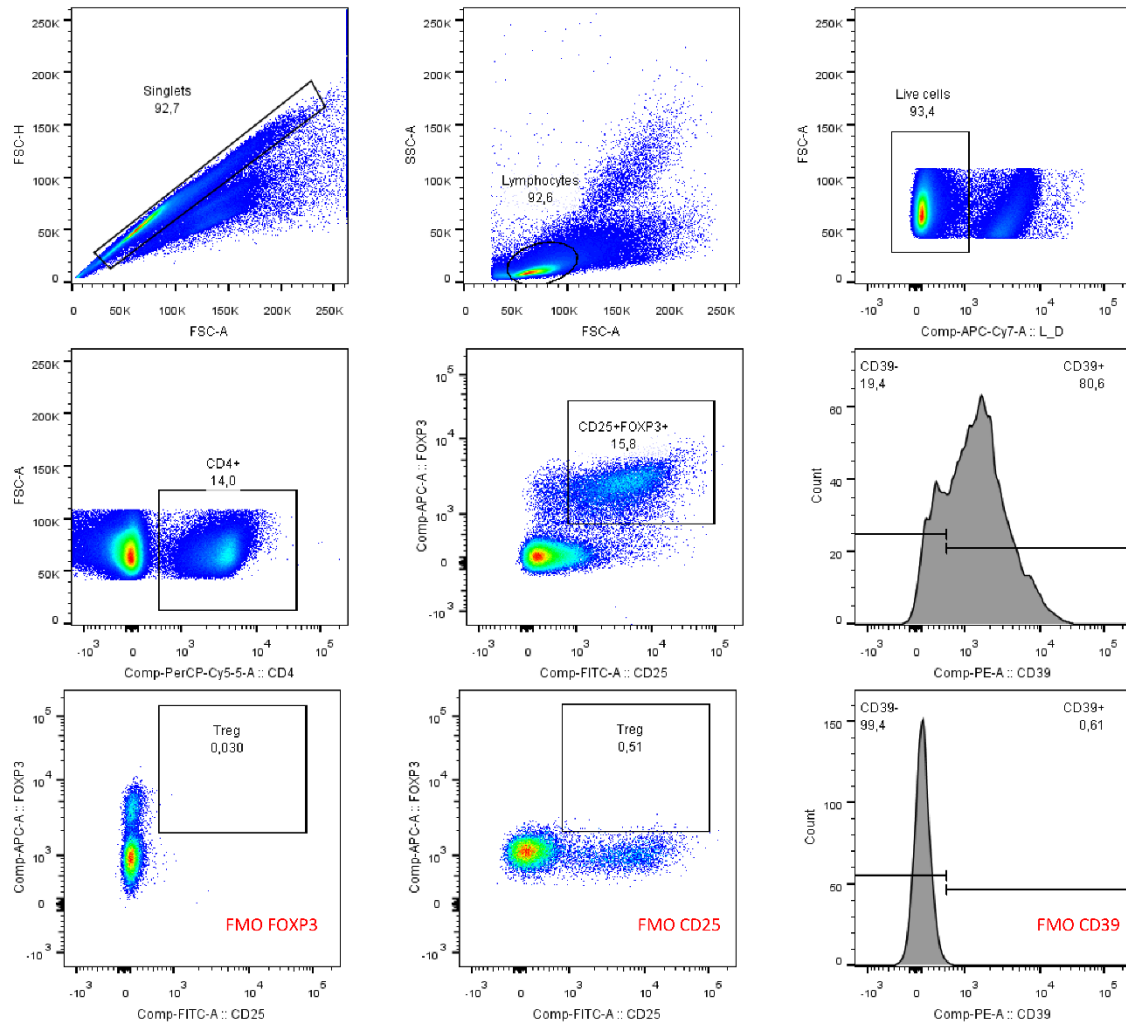
O sangue dos animais foi coletado do seio venoso, armazenado por 30 minutos em tubo de 1,5ml (Eppendorf) para formação de coágulo e depois centrifugado por 10 minutos a 500RCF. O soro foi pipetado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de citocinas. Já os linfonodos poplíteo e inguinal direitos (linfonodos drenantes da articulação acometida) foram dissecados e macerados contra uma peneira estéril de  $70\mu\text{m}$  (Corning), seguida de lavagem com tampão fosfato-salino [do inglês, *phosphate buffered saline* (GIBCO)] estéril. A viabilidade das células foi checada pelo uso do corante Trypan Blue (Invitrogen) e contagem realizada na câmara de Neubauer sob microscopia ótica convencional.

### 3.8 Fenotipagem dos linfócitos murinos por citometria de fluxo

Um milhão de linfócitos dos linfonodos drenantes de cada animal foram marcados com os seguintes anticorpos: anti-CD4 conjugado a PERCP (1:200, Biolegend), anti-CD25 conjugado a BB515 (1:200, BD), anti-CD39 conjugado a PE (1:100, Biolegend) e anti-FOXP3 conjugado a APC (1:200, Biolegend). A leitura foi realizada com citômetro FACS Verse (BD) e a análise dos dados foi realizada por meio do software FlowJo v10 (BD). A **Figura 7** descreve a estratégia de *gates* utilizada durante a citometria de fluxo.



Figura 7. Estratégia de *gates* nos experimentos de citometria em camundongos artríticos.



CD: cluster of differentiation; FSC-H: forward scatter-high; FSC-A: forward scatter-area; SSC-A: side scatter-area; FMO: Fluorescence Minus One Control.

### 3.9 Análise estatística

As variáveis quantitativas dos indivíduos e dos experimentos animais foram analisadas usando o teste *t-student* quando dois grupos eram comparados. Variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos usando teste de Fisher. As análises estatísticas dos dados quantitativos com múltiplos grupos foram realizadas pelos métodos de análise multivariada MANOVA e/ou ANOVA ONE-WAY (TWO-WAY apenas para a análise de dor com o teste de von Frey). O teste t pareado foi utilizado para analisar as variações de citocinas antes e depois do tratamento com MTX. Para a análise da curva ROC da expressão de CD39 em CD39+Treg, utilizamos um intervalo de confiança de 95% e o método de Wilson/Brown, relatado em

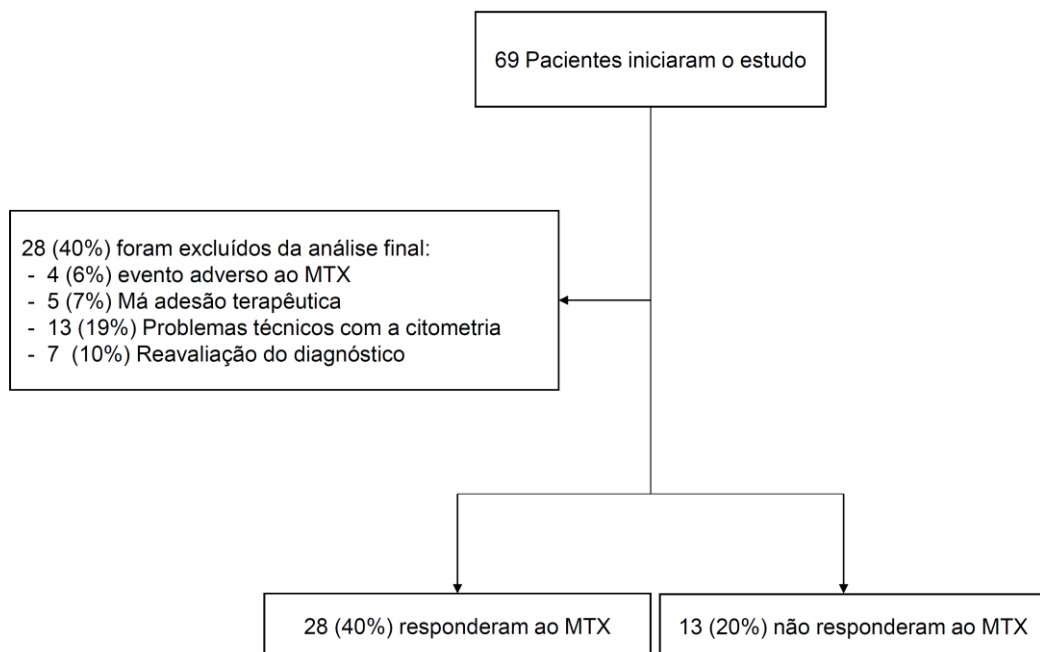
porcentagem. Foram consideradas diferenças significativas para valores de  $p < 0,05$ . Para análise estatística, foram utilizados os softwares GraphPad Prism 9 e JMP® Statistical Software.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM AR

Entre janeiro de 2017 e julho de 2019, 69 pacientes foram recrutados para este ensaio clínico e submetidos a coleta inicial. Deste total, 40% foram excluídos ao longo do estudo seja pela presença de eventos adversos importantes ao metotrexato que levaram à suspensão da droga, má adesão terapêutica, dados citométricos que não passaram no controle de qualidade ou surgimento de diagnóstico alterativo (alguns pacientes posteriormente preencheram critérios diagnósticos para síndrome de Sjögren e outros apresentaram lesões cutâneas sugestivas de psoríase). Dos pacientes que concluíram o estudo, 2/3 responderam ao tratamento com MTX (**Figura 8**).

**Figura 8 - Fluxograma de pacientes incluídos na pesquisa.**



A média da idade dos pacientes foi de 56 anos e a grande maioria (85%) foi constituída de mulheres. Os pacientes apresentaram tempo médio de início dos sintomas de 11 meses, sendo uma pequena parcela constituída de tabagistas ativos (5%). O fator reumatoide foi positivo em apenas 58%, enquanto o anti-CCP foi detectado em 68% dos pacientes. A grande maioria dos pacientes apresentou grave

atividade da doença e importante limitação funcional, conforme demonstrado pela realização dos escores compostos de atividade da doença (DAS28, CDAI e SDAI) e questionário de incapacidade HAQ-DI (**Tabela 2**).

**Tabela 2 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes.**

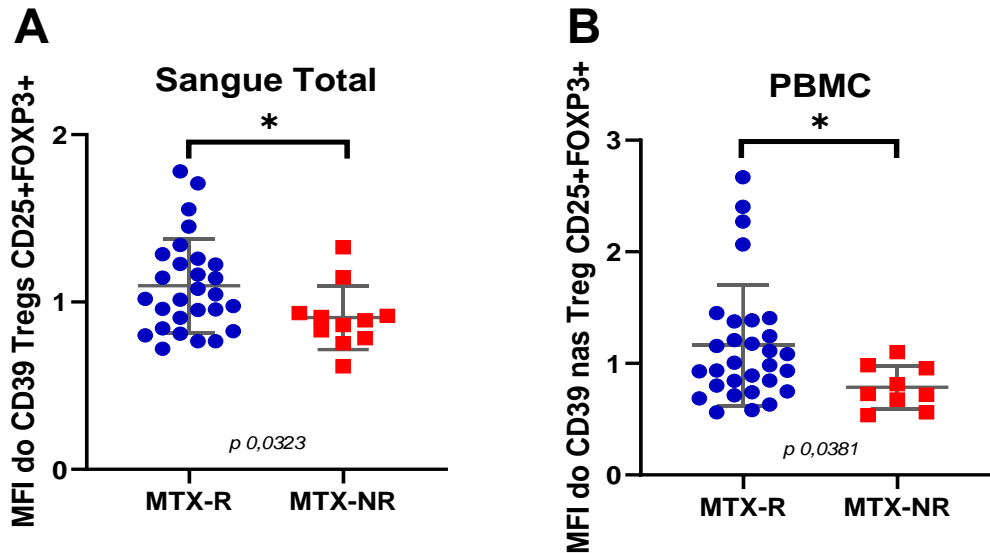
<b>Características</b>	<b>N= 41</b>
Idade $\pm$ DP – anos	56 $\pm$ 12
Mulheres – n <sup>o</sup> (%)	35 (85%)
Duração dos sintomas $\pm$ DP – meses	11 $\pm$ 8,2
Uso de tabaco – n <sup>o</sup> (%)	
Tabagismo prévio	13 (32%)
Tabagismo atual	2 (5%)
Fator Reumatoide positivo – n <sup>o</sup> (%)	24 (58%)
Anti-CCP positivo – n <sup>o</sup> (%)	28 (68%)
VHS $\pm$ DP - mm	35 $\pm$ 21
PCR $\pm$ DP - mg/dl	2,9 $\pm$ 3,4
DAS28 $\pm$ DP	6,01 $\pm$ 1,04
CDAI $\pm$ DP	35,5 $\pm$ 10,8
SDAI $\pm$ DP	38,4 $\pm$ 11,2
HAQ-DI $\pm$ DP	1,34 $\pm$ 0,68

DP: desvio padrão, anti-CCP: anticorpo anti peptídeo citrulinado cíclico, VHS: velocidade de hemossedimentação, PCR: proteína C reativa, DAS28: *Disease Activity Score 28 Joints*, CDAI: *Clinical Disease Activity Index*, SDAI: *Simplified Disease Activity Index*, HAQ-DI: *Health Assessment Questionnaire Disability Index*.

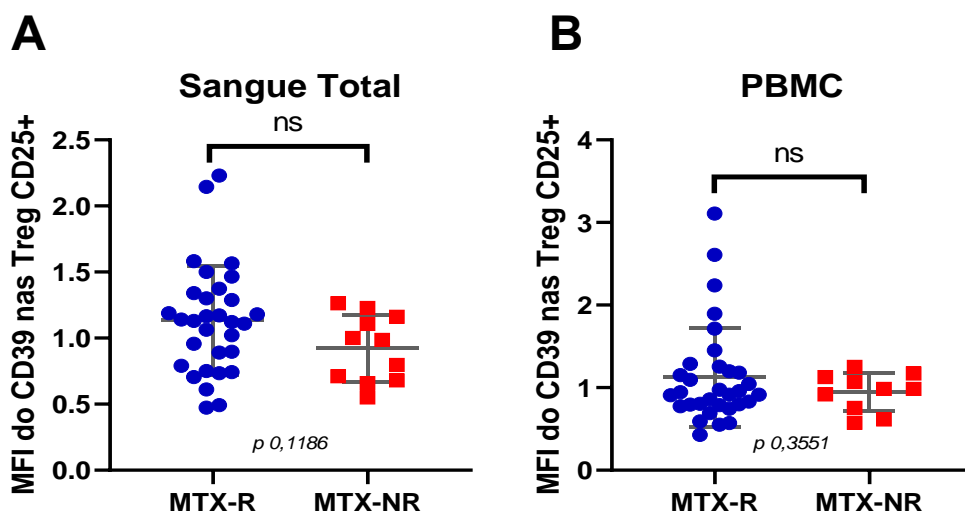
#### **4.2. EXPRESSÃO DE CD39 EM TREG CIRCULANTES EM INDIVÍDUOS COM AR**

Pacientes com AR respondedores ao MTX (MTX-R) tiveram uma maior expressão de CD39 em Tregs isoladas tanto a partir do PBMC ( $p = 0,0323$ ) quanto a

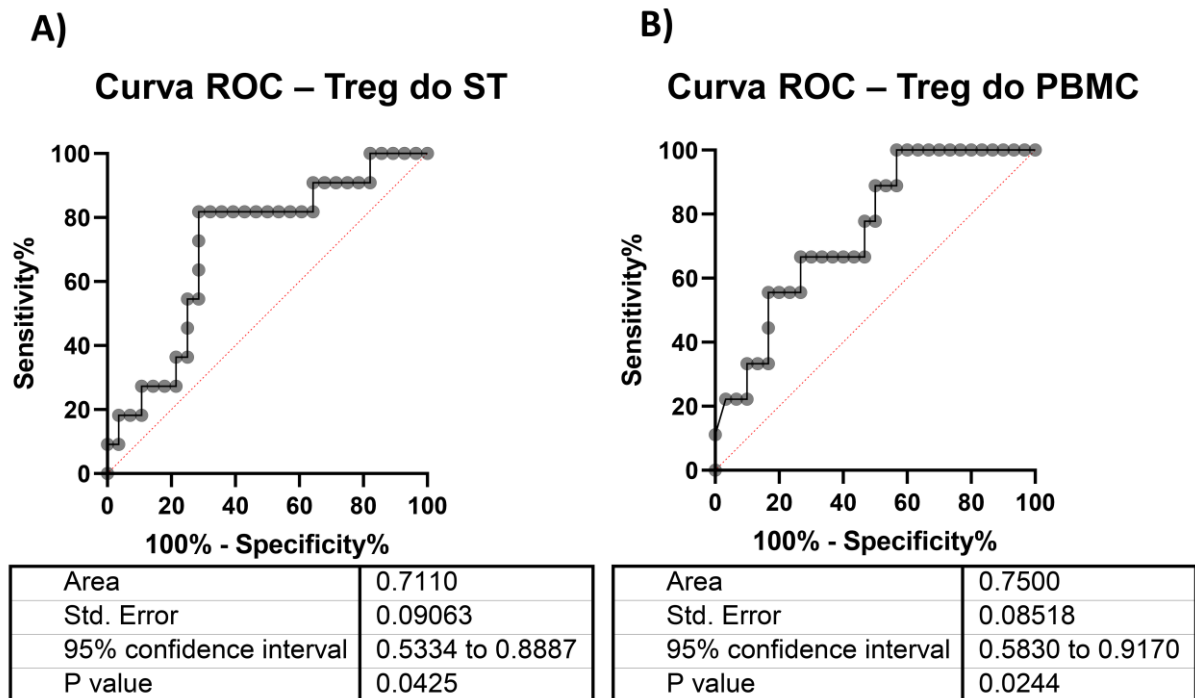
partir do sangue total ( $p = 0,0381$ ) antes do início do tratamento (**Figura 9**). Foi utilizada a razão entre a média de intensidade da fluorescência (*Mean Fluorescent Intensity - MFI*) de CD39 em pacientes em relação ao mesmo indivíduo controle saudável.



**Figura 9** - MFI de CD39 nas células CD4+CD25+FOXP3+CD39+ (CD39+Treg) do (A) sangue total e (B) PBMC de pacientes com artrite reumatoide em relação ao mesmo controle saudável (razão paciente/controle). MFI: *Mean Fluorescence Intensity*, PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*; MTX-R: respondedores ao metotrexato; MTX-NR: não respondedores ao metotrexato; \*  $p < 0,05$ .



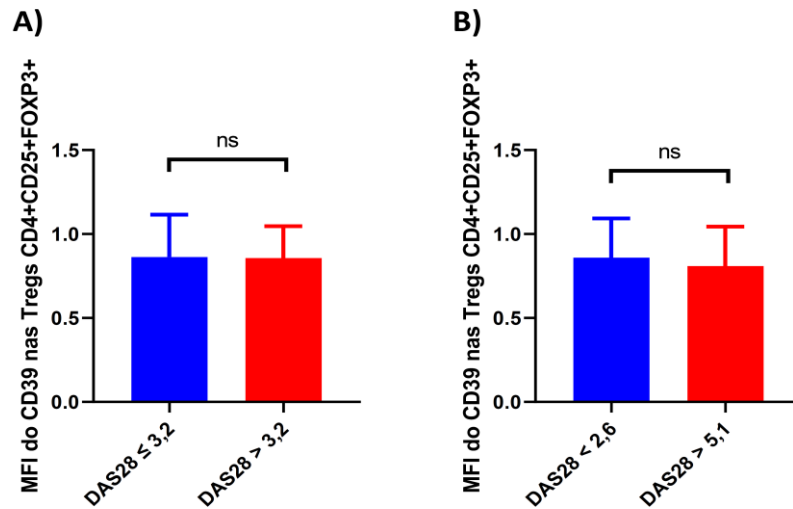
**Figura 10** - MFI de CD39 em células CD4+CD25+CD39+ do (A) sangue total e (B) PBMC de pacientes com artrite reumatoide em relação ao mesmo controle saudável (razão paciente/controle). MFI: *Mean Fluorescence Intensity*, PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*. MTX-R: respondedores ao metotrexato. MTX-NR: não respondedores ao metotrexato; ns: não significante.



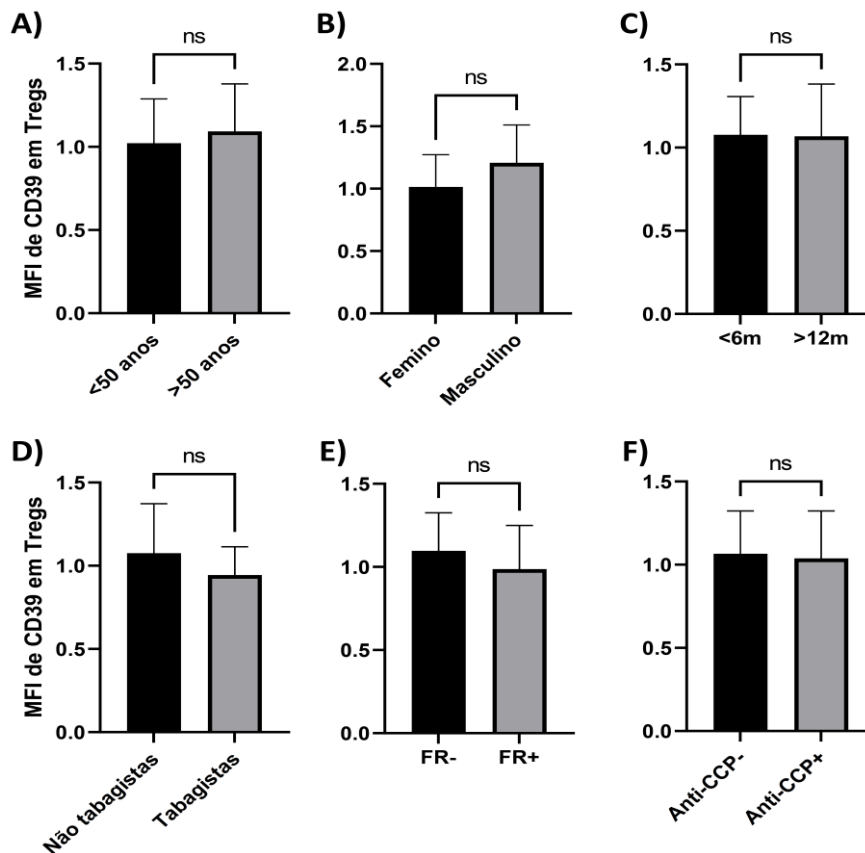
**Figura 11** - Curva ROC do MFI de CD39 nas Treg em ST (A) e PBMC (B) de pacientes com artrite reumatoide como preditor de resposta ao tratamento. PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*; ST: sangue total; ROC: *receiver operating characteristic*.

Em uma tentativa de tornar o exame mais simples, sem a necessidade de permeabilização celular e marcação intracelular com anticorpo anti-FOXP3, realizamos a análise da expressão do CD39 em células CD4+CD25+, porém não observamos uma diferença significativa entre os grupos (**Figura 10**), sugerindo que o do marcador FOXP3 é particularmente importante no painel de anticorpos para a utilização do CD39 como biomarcador. A análise da curva ROC gerada com o MFI do CD39 em Tregs do sangue total apresentou uma área sob a curva de 0.7110 e  $p = 0.0425$ , quanto que no PBMC, área sob a curva de 0.75 e  $p = 0.0244$  (**Figura 11**).

Curiosamente, não foi observada diferença estatística na expressão do CD39 quando comparados pacientes com doença em remissão/baixa atividade versus pacientes com doença em moderada/alta atividade, e nem mesmo quando comparamos os extremos: remissão versus alta atividade (**Figura 12**). Além disso, a expressão do CD39 não variou em relação à idade, sexo, tempo de sintomas, tabagismo e positividade de autoanticorpos (**Figura 13**).

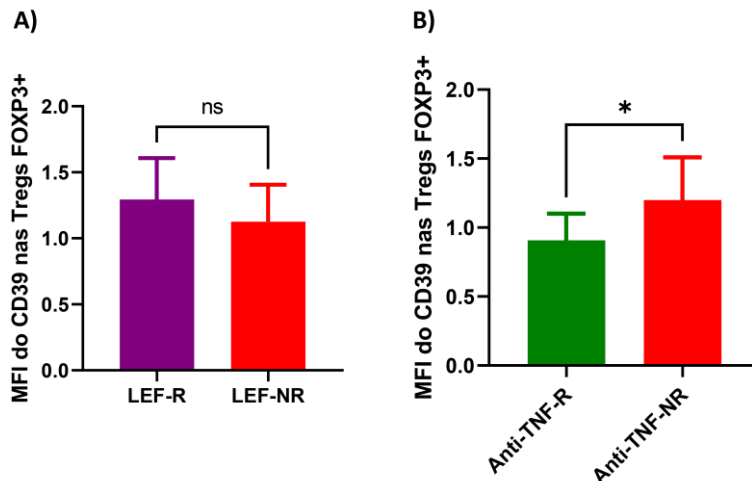


**Figura 12** - Avaliação da correção entre nível de atividade da doença e a expressão de CD39 em Tregs CD4+CD25+FOXP3+ isoladas do PBMC de pacientes com artrite reumatoide estabelecida (mais de dois anos de doença). **A)** Comparativo entre pacientes com remissão/baixa atividade (DAS28 ≤ 3,2) versus moderada/alta atividade (DAS28 > 3,2). **B)** Comparativo entre pacientes com doença em remissão (DAS28 < 2,6) e alta atividade (DAS > 5,1).

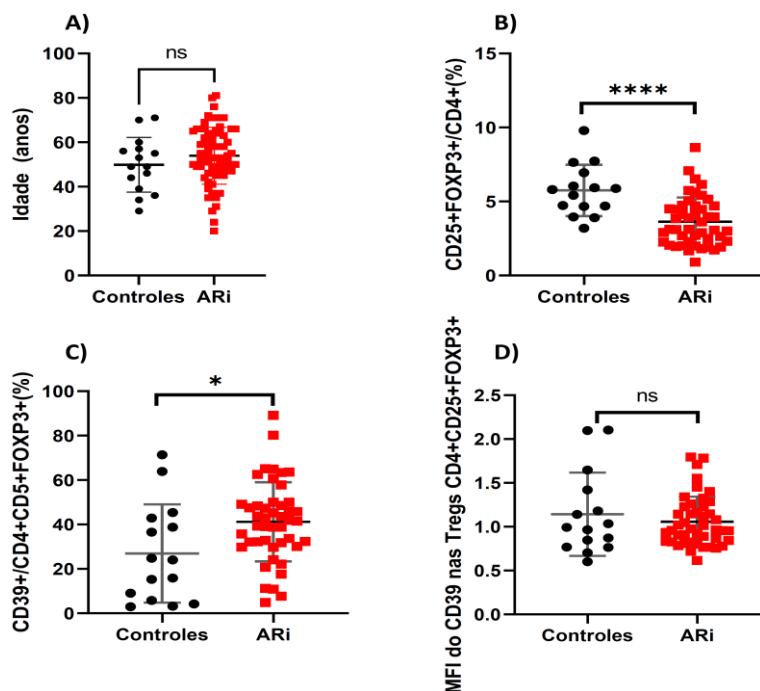


**Figura 13** – Correlação entre a expressão do CD39 e variáveis secundárias: **A)** idade, **B)** sexo, **C)** tempo de início dos sintomas, **D)** história de tabagismo, **E)** presença de fator reumatoide e **F)** anti-CCP. FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; m: meses. MFI: *mean fluorescence intensity*; ns: não significante.

Analisando o subgrupo que falhou a MTX, observa-se que a expressão inicial de CD39 não se correlaciona com a resposta terapêutica à leflunomida. Por outro lado, respondedores aos anti-TNF apresentam maior expressão de CD39 que os não respondedores (**Figura 14**).



**Figura 14** – Expressão do CD39 em Tregs analisadas a partir do sangue total de pacientes com artrite reumatoide estabelecida. **A)** Não houve diferença na expressão do CD39 em pacientes respondedores (LEFLU-R) versus não respondedores (LEFLU-NR) à leflunomida. Entretanto, pacientes respondedores ao anti-TNF (anti-TNF-R) apresentam baixa expressão de CD39 em suas Tregs quando comparados a não respondedores (anti-TNF-NR) (**B**). ns: não significativo. \*  $p < 0,05$ .



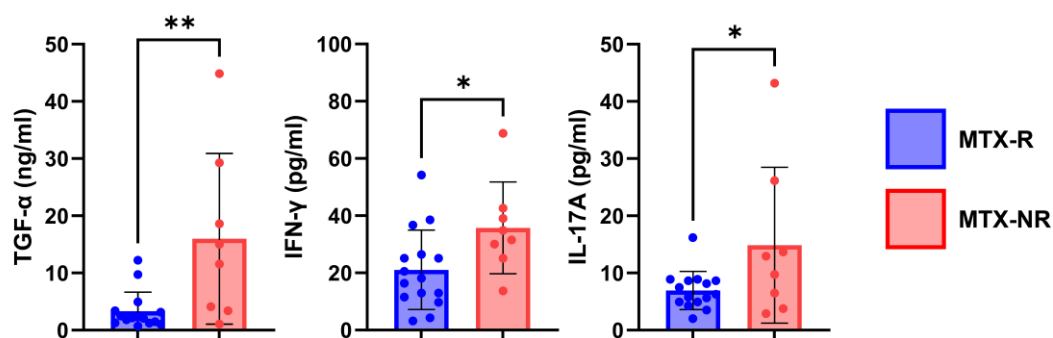
**Figura 15** – Análise da expressão do CD39 no sangue total em indivíduos saudáveis pareados para idade e sexo. **A)** Os indivíduos controles apresentam idade semelhante aos pacientes com artrite reumatoide inicial (ARi). **B)** Pacientes com ARi apresentam menor proporção de células de células Treg no sangue periférico quando comparado a pessoas saudáveis, contudo apresentam uma maior proporção de células TregCD39+ (**C**). Já o MFI do CD39 nas Treg foi semelhante nos dois grupos comparados. ns: não significativo; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



Pacientes com ARi apresentam MFI de CD39 nas Treg semelhante a controles saudáveis, apesar de possuírem proporcionalmente mais TregCD39+. Corroborando dados encontrados na literatura, os pacientes com ARi possuem menor proporção de células TregFOXP3 circulantes (**Figura 15**).

### 4.3. PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PLASMÁTICAS NA ARTRITE REUMATOIDE

Em uma tentativa de aumentar a acurácia do kit, um estudo piloto com 24 pacientes com artrite reumatoide inicial, 14 pacientes pós-tratamento com MTX e 10 controles saudáveis foi realizado, onde 42 citocinas e quimiocinas inflamatórias foram dosadas no plasma. Curiosamente, os níveis de TGF- $\alpha$  ( $p$  0.0043, 95% IC 4.4 a 20.9), IFN- $\gamma$  ( $p$  0.0326, 95% IC 1.3 a 27.9) e IL-17A ( $p$  0.0418, 95% IC 0.3 a 15.5) mostraram-se mais elevados em pacientes MTX-R em comparação aos MTX-NR ao diagnóstico da doença (**Figura 16 e Tabela 3**).



**Figura 16 – Expressão diferencial de citocinas em MTX-R e MRX-NR.** Pacientes não respondedores ao metotrexato (MTX-NR) possuem concentrações plasmáticas mais elevadas de TGF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17A ao diagnóstico da doença quanto comparados a pacientes respondedores ao tratamento (MTX-R). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

Em relação à evolução dos níveis das citocinas, pacientes MTX-R apresentam redução significativa dos níveis de IL-10 ( $p$  0.0320, 95% IC -26,5 a -1.5), IL-7 ( $p$  0.0335, 95% IC -11.6 a -0.5), IL-17A ( $p$  0.0233, 95% IC -4.1 a -0.4) e VEGF ( $p$  0.0286, 95% IC -134.4 a -9.6) (**Figura 17 e Tabela 4**), enquanto os pacientes MTX-NR não apresentam alterações significativas após o tratamento com MTX (**Tabela 5**).

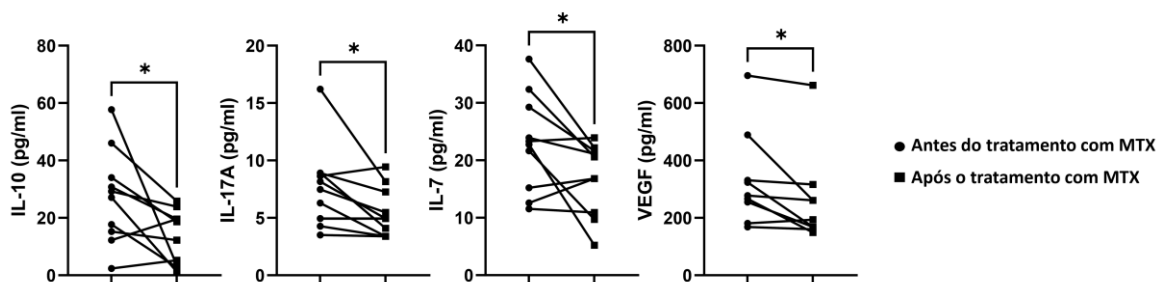
Conforme esperado, quando comparados aos indivíduos controle, pacientes com AR apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de citocinas relacionadas à produção e/ou ativação linfócitos (IL-1, IL-7, IL-17, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), ativação de

fibroblastos (FGF-2, MCP-3), macrófagos (TNF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), granulócitos (G-CSF, GM-CSF, IL5, IL-8) e células endoteliais/angiogênese (VEGF) (**Figura 18 e Tabela 6**).

**Tabela 3 – Citocinas como biomarcadores de resposta ao MTX.**

Citocinas	Teste <i>t</i> (valor p)	Citocinas	Teste <i>t</i> (valor p)	Citocinas	Teste <i>t</i> (valor p)
EGF	0,94	IL-12 P40	0,97	IL-4	0,29
FGF-2	0,33	MDC	0,26	IL-5	0,30
Eoxatina	0,83	IL-12 P70	0,24	IL-6	0,29
TGF- $\alpha$	0,0043**	IL-13	0,33	IL-7	0,26
G-CSF	0,20	IL-15	0,84	IL-8	0,47
FLt-L3	0,25	sCD40L	0,91	IP-10	0,24
GM-CSF	0,30	IL-17	0,0418*	MCP-1	0,75
Fractalkina	0,21	IL-1 RA	0,57	MIP-1 $\alpha$	0,41
IFN- $\alpha$	0,18	IL-1 $\alpha$	0,17	MIP-1 $\beta$	0,0974
IFN- $\gamma$	0,0326*	IL-9	0,12	TNF- $\alpha$	0,0904
GRO	0,64	IL-1 $\beta$	0,59	TNF- $\beta$	0,92
IL-10	0,22	IL-2	0,97	VEGF	0,11
MPC-3	0,0643	IL-3	0,15	--	--

Diferença das citocinas plasmáticas entre pacientes MTX-R e MTX-NR ao diagnóstico da doença (teste *t* não pareado). MTX-R: respondedores ao metotrexato. MTX-NR: não respondedores ao metotrexato.



**Figura 17 – Modulação de citocinas plasmáticas após o tratamento com MTX.** Pacientes não respondedores ao metotrexato (MTX-R) evoluem com uma queda significativa dos níveis plasmáticos de IL-10, IL-17A, IL-7 e VEGF após o tratamento. IL: interleucina; MTX: metotrexato; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; \*  $p < 0,05$ .

Tabela 4 – Evolução das citocinas em pacientes MTX-R.

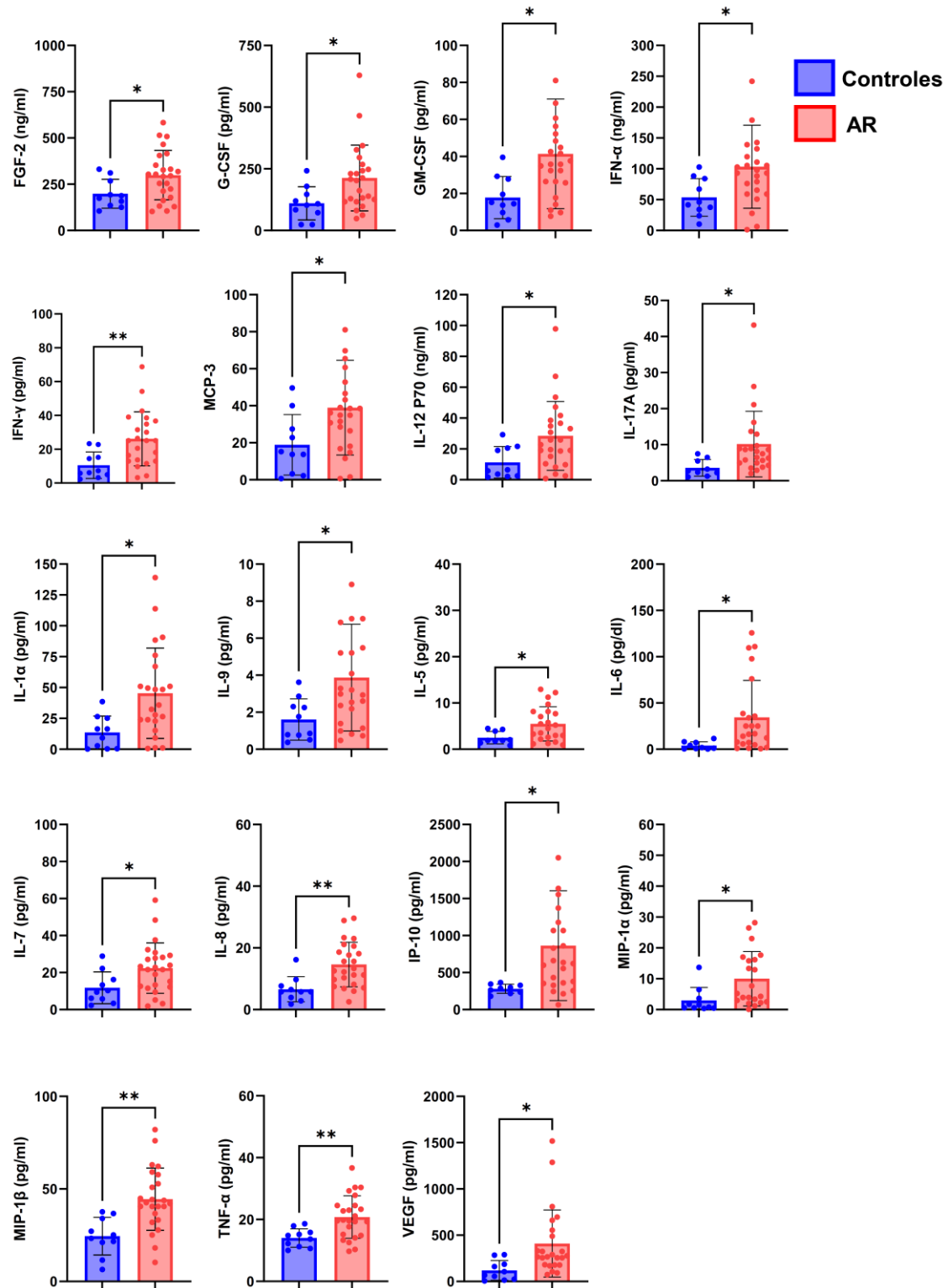
Citocinas	Teste t (valor p)	Citocinas	Teste t (valor p)	Citocinas	Teste t (valor p)
EGF	0.8001	IL-12 P40	0.5717	IL-4	0.9672
FGF-2	0.8634	MDC	0.8755	IL-5	0.0526
Eotaxina	0.1937	IL-12 P70	0.1297	IL-6	0.1528
TGF- $\alpha$	0.0686	IL-13	0.8321	IL-7	0.0335*
G-CSF	0.4760	IL-15	0.4096	IL-8	0.1318
FLt-L3	0.2484	sCD40L	0.3255	IP-10	0.4504
GM-CSF	0.4789	IL-17A	0.0233*	MCP-1	0.5235
Fractalkina	0.0931	IL-1 RA	0.8441	MIP-1 $\alpha$	0.4314
IFN- $\alpha$	0.3855	IL-1- $\alpha$	0.1915	MIP-1 $\beta$	0.6117
IFN- $\gamma$	0.1484	IL-9	0.4474	TNF- $\alpha$	0.6447
GRO	0.5312	IL-1 $\beta$	0.7106	TNF- $\beta$	0.8889
IL-10	0.0320*	IL-2	0.7653	VEGF	0.0286*
MPC-3	0.5816	IL-3	0.1228	--	

Diferença nos níveis plasmáticos das citocinas antes e após o tratamento com MTX em pacientes MTX-R (teste *t* pareado). MTX: metotrexato. MTX-R. Respondedores ao metotrexato.

Tabela 5 - Evolução das citocinas em pacientes MTX-NR.

Citocinas	Teste t (valor p)	Citocinas	Teste t (valor p)	Citocinas	Teste t (valor p)
EGF	0.4199	IL-12 P40	0.9807	IL-4	0.5459
FGF-2	0.7327	MDC	0.1269	IL-5	0.5171
Eotaxina	0.5450	IL-12 P70	0.8402	IL-6	0.7917
TGF- $\alpha$	0.4480	IL-13	0.2805	IL-7	0.6844
G-CSF	0.6069	IL-15	0.3423	IL-8	0.5093
FLt-L3	0.6613	sCD40L	0.3036	IP-10	0.9950
GM-CSF	0.9343	IL-17A	0.4334	MCP-1	0.9945
Fractalkina	0.6354	IL-1 RA	0.7718	MIP-1 $\alpha$	0.1774
IFN- $\alpha$	0.8202	IL-1- $\alpha$	0.7285	MIP-1 $\beta$	0.6426
IFN- $\gamma$	0.4554	IL-9	0.6931	TNF- $\alpha$	0.2401
GRO	0.0599	IL-1 $\beta$	0.8420	TNF- $\beta$	0.5471
IL-10	0.6306	IL-2	0.5334	VEGF	0.4197
MPC-3	0.7253	IL-3	0.6165	--	

Diferença nos níveis plasmáticos das citocinas antes e após o tratamento com MTX em pacientes MTX-NR (teste *t* pareado). MTX: metotrexato; MTX-NR: não respondedores ao metotrexato.



**Figura 18 – Perfil de citocinas inflamatórias na AR.** Citocinas significativamente mais elevadas no plasma de pacientes com artrite reumatoide comparadas a indivíduos saudáveis. AR: artrite reumatoide. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

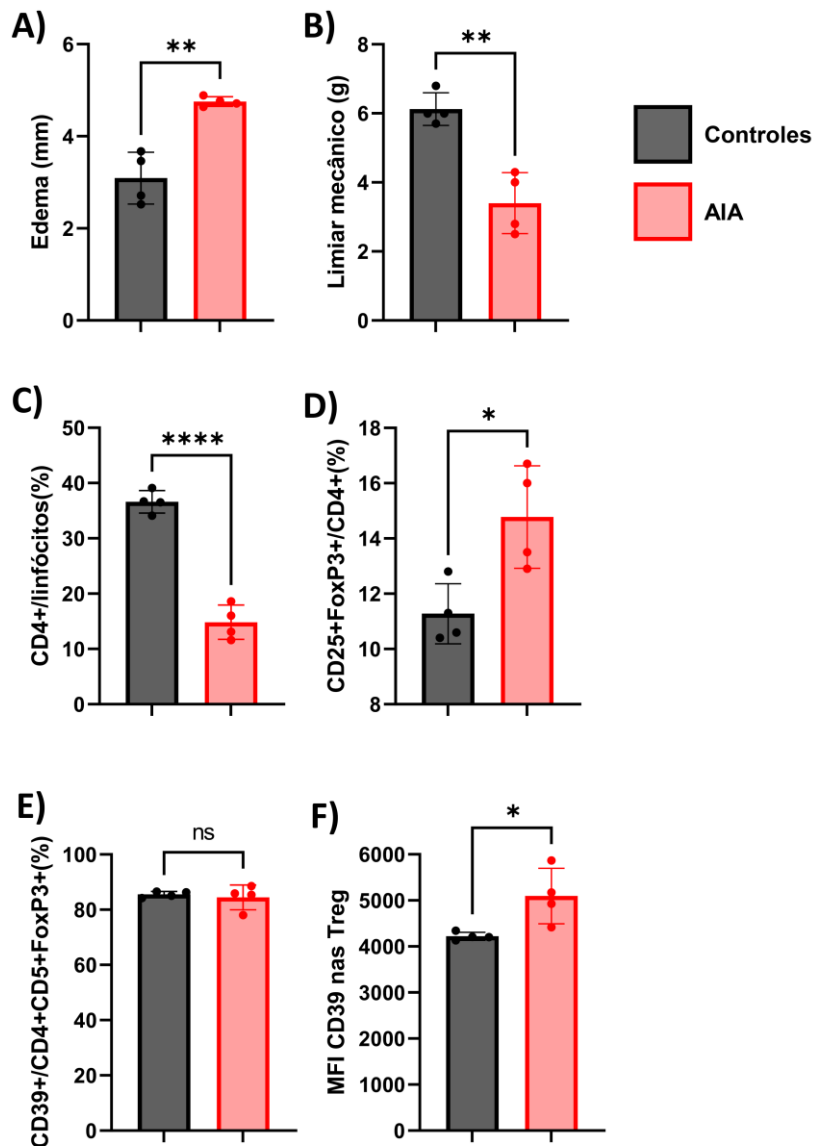
Tabela 6 – Citocinas diferencialmente expressas na AR.

Citocinas	Teste t (valor p)	Citocinas	Teste t (valor p)	Citocinas	Teste t (valor p)
EGF	0.3912	IL-12 P40	0.0790	IL-4	0.3581
FGF-2	0.0354*	MDC	0.1667	IL-5	0.0270*
Eotaxina	0.2995	IL-12 P70	0.0271	IL-6	0.0306*
TGF- $\alpha$	0.0592	IL-13	0.2476	IL-7	0.0302*
G-CSF	0.0276*	IL-15	0.1969	IL-8	0.0025*
FLt-L3	0.1552	sCD40L	0.7530	IP-10	0.0266*
GM-CSF	0.0211*	IL-17A	0.0414*	MCP-1	0.2363
Fractalkina	0.0564	IL-1 RA	0.0536	MIP-1 $\alpha$	0.0244*
IFN- $\alpha$	0.0331*	IL-1- $\alpha$	0.0125*	MIP-1 $\beta$	0.0014**
IFN- $\gamma$	0.0064**	IL-9	0.0233*	TNF- $\alpha$	0.0054**
GRO	0.4047	IL-1 $\beta$	0.0754	TNF- $\beta$	0.2859
IL-10	0.0511	IL-2	0.0562	VEGF	0.0190*
MPC-3	0.0292*	IL-3	0.1834	--	--

Citocinas plasmáticas em pacientes com AR vs controles saudáveis (teste *t* não pareado). AR: artrite reumatoide.

#### 4.4. EXPRESSÃO DE CD39 EM TREG NA ARTRITE EXPERIMENTAL

Uma vez que o sistema purinérgico é altamente conservado entre os mamíferos, um modelo murino de artrite inflamatória foi utilizado para avaliar as mudanças fenotípicas das células Treg no contexto de doença e diversos tratamentos. Foi observado que camundongos com Artrite Induzida por Antígeno (AIA) apresentam, como esperado, um aumento significativo do diâmetro da articulação desafiada e redução do limiar de dor (**Figura 19 A e B**). Ao analisar os linfócitos obtidos dos linfonodos drenantes (poplíteo e inguinal), notamos que a artrite gerou uma redução considerável na proporção de linfócitos T CD4+ (**Figura 19C**), ao passo que induziu uma expansão das células T reguladoras (**Figura 19D**). No tocante à expressão de CD39 nas Treg, este modelo de artrite não interferiu na proporção de células TregCD39+ (**Figura 19E**), mas levou a um aumento na densidade desta ectoenzimas na superfície das TregCD39+ (**Figura 19F**).

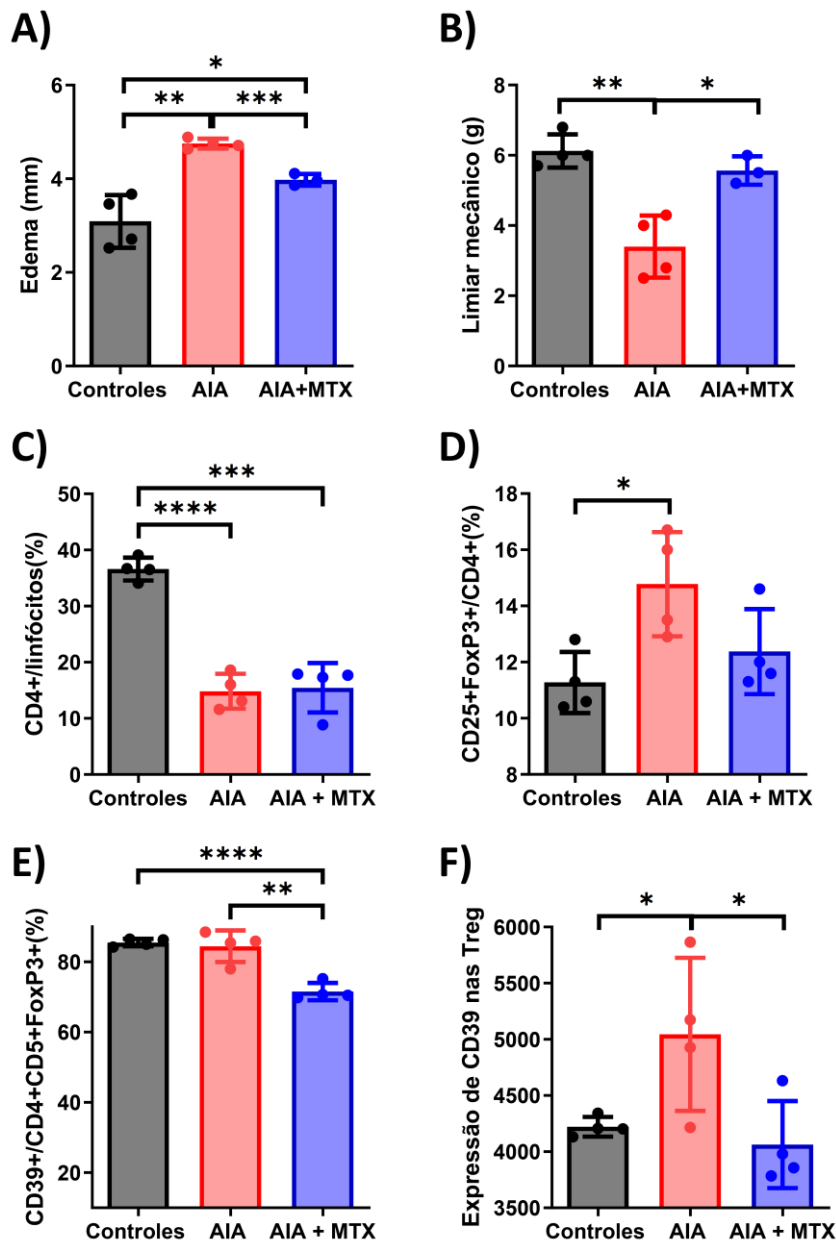


**Figura 19 – Artrite induzida antígeno (AIA) em camundongos** leva a um aumento do volume articular (A) e redução do limiar doloroso (B) de modo semelhante à AR. Gera uma redução na proporção de linfócitos T CD4+ (C) ao mesmo tempo que aumenta a proporção das Treg (D). Apesar de não interferir na proporção de células TregCD39+ (E), induz um aumento na densidade dessa ectoenzimas na superfície da das TregCD39+ (F). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

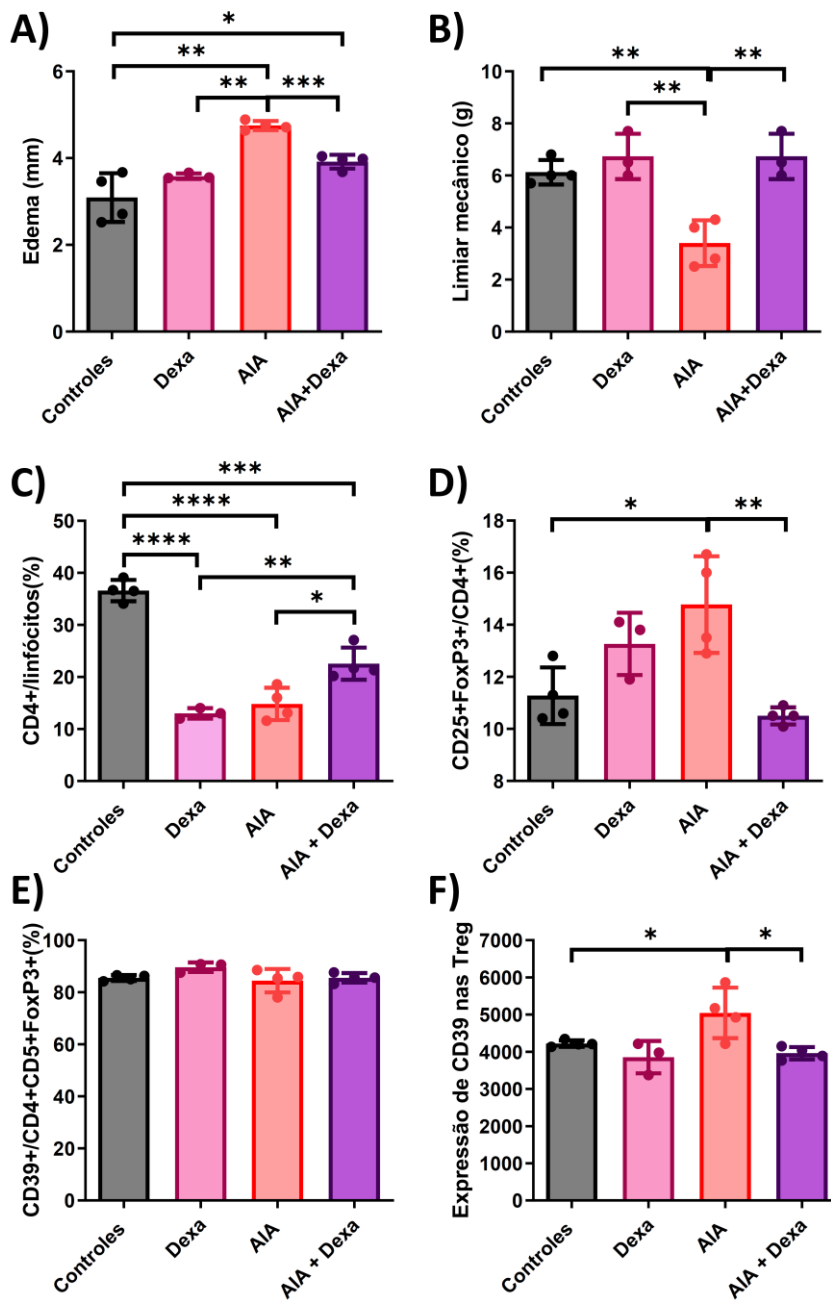
O tratamento com MTX foi capaz de reduzir de modo significativo a dor (Figura 20A) e edema articular (Figura 20B), porém não interferiu na proporção de linfócitos T CD4+ (Figura 20C). Adicionalmente, o tratamento com esta droga gera uma aparente redução ( $p = 0,06$ ) da proporção de Treg circulantes, redução na proporção de células CD39+ e redução no MFI de CD39 nas Tregs (Figura 20D-F).

Já o tratamento com dexametasona foi capaz de reverter a anodinia mecânica a níveis semelhantes aos camundongos controle, enquanto reduziu parcialmente o edema articular (Figuras 21 A e B). Diferentemente do tratamento com MTX, a dexametasona foi capaz de reverter parcialmente a queda proporcional dos linfócitos

T CD4 (**Figura 21C**). A droga não interfere na proporção de TregCD39+, porém reverte a expansão das Treg e aumento do MFI de CD39 nas Treg inicialmente induzidos pela artrite (**Figura 21 D-F**). Este dado sugere que a regressão das Treg e do MFI de CD39 seja causado pela redução do estímulo pró-inflamatório aos diversos tratamentos, e não a um mecanismo fármaco-específico.



**Figura 20. Efeito do tratamento com metotrexato.** Animais artríticos tratados com metotrexato apresentam melhora da doença demonstrada por meio da redução da dor (**A**) e do edema articular (**B**). Os animais com artrite apresentaram redução importante da proporção de células T CD4+, redução esta que se manteve mesmo após o tratamento (**C**). A indução de artrite gera um discreto aumento na população de células T circulantes (**D**), porém não influenciada pelo tratamento com o MTX. Por outro lado, o tratamento com MTX está relacionado à uma redução no número de células CD39+ (**E**) e na redução do MFI de CD39 nas células TregCD39+ (**F**). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



**Figura 21. Efeito do tratamento com dexametasona.** Animais artríticos tratados com dexametasona apresentam melhora da doença demonstrada por meio da redução da dor (A) e do edema articular (B). Animais artríticos e animais controle (sem doença) tratados com dexametasona apresentam redução acentuada na proporção das células T CD4<sup>+</sup> circulantes, com recuperação parcial nos camundongos artríticos tratados com dexametasona (C). Animais artríticos apresentam elevação das Treg circulantes, porém revertidos após tratamento com dexametasona. A dexametasona não influenciou o número das TregCD39<sup>+</sup> (E), porém reverteu o aumento do MFI de CD39 nas Treg em animais artríticos (F). . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



#### 4.5. CITOCINAS SÉRICAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE

Uma análise multiplex de 32 citocinas no soro de camundongos artríticos e tratados foi realizada com o intuito de verificar se o modelo AIA é capaz de gerar uma resposta inflamatória sistêmica semelhante à AR, bem como avaliar impacto dos diversos tratamentos na expressão dessas citocinas (**Tabela 7**).

O modelo AIA gerou um aumento significativo de IL-1 e IL-6, duas citocinas pró-inflamatórias amplamente reconhecidas na fisiopatologia da AR. Além disso, houve aumento de G-CSF (granulocyte colony-stimulating fator, citocina envolvida na produção, diferenciação e ativação de células de linhagem mieloide), KC (*keratinocyte chemoattractant*, também conhecido como CXCL1, quimiocina envolvida no recrutamento de leucócitos no tecido sinovial), IL-4 (citocina da família Th2 que possui papel regulatório AR), MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein*, também conhecido como CCL3, quimiocina produzida por macrófagos envolvida na reabsorção óssea) e IP-10 (interferon  $\gamma$ -induced protein 10 kDa, também conhecida como CXCL10, quimiocina envolvida no recrutamento de linfócitos T CD4 e CD8). De modo inesperado, este modelo de artrite não gerou aumento nos níveis séricos de TNF- $\alpha$ .

O tratamento com metotrexato gerou uma redução significativa de G-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-6 e KC/CXCL. Apesar de não ter ocorrido uma regulação positiva com a indução da doença, o tratamento com MTX gerou uma redução significativa nos níveis de GM-CSF (fator de crescimento produzido por linfócitos e envolvido na ativação e maturação de macrófagos), IL-3 (fator estimulador de colônia que estimula a produção das três linhagens precursoras mieloides), IL-10, IL-12 p40 (citocina pró-inflamatória envolvida na resposta Th1), MIP-1 $\beta$  (também conhecida como CCL4, quimiocina envolvida no recrutamento de células NK, monócitos e linfócitos) e MIP-2 (também conhecida como CXCL2, quimiocina envolvida no recrutamento e ativação de neutrófilos), bem como um aumento dos níveis de eotaxin (também conhecido como CCL11, quimiocina envolvida no recrutamento de eosinófilos, basófilos, macrófagos e células dendríticas), IL-2 (citocina pleitrópica envolvida na regulação de linfócitos B e T), IL-5 (quimiocina envolvida no recrutamento de leucócitos e com função pró-resolutiva), IL-15 (citocina envolvida na osteoclastogênese e ativação de células NK), IP-10, MIP-1 $\alpha$ , RANTES (*Regulated upon Activation Normal T cell*

*Expressed and Secreted*, quimiocina pleiotrópica associada ao recrutamento de linfócitos) e VEGF (*vascular endothelial growth factor*, envolvido na angiogênese).

Já o tratamento com etanercepte gerou uma redução dos níveis de GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12 p40, IL-13, RANTES, VEGF, assim como um aumento de IL-5, MIG. Por sua vez, a administração de baricitinibe reduziu os níveis de GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 p 40, IL-12 p70, LIF, IL-13, IL-15, MIP-1alfa, MIP-2, assim como um aumento nos níveis de LIX, MIG e TNF- $\alpha$ . Por fim, o tratamento com dexametasona reduziu os níveis séricos de GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12p40, IL-12 p70, LIF, IL-13, IL-15, KC e MIP-2, ao passo que aumentou os níveis de IL-5.

**Tabela 7 – Modulação de citocinas séricas durante artrite experimental e tratamento com drogas imunossupressoras.**

	AIA	AIA+MTX	AIA+DEXA	AIA+ETA	AIA+BARI
<b>G-CSF</b>	↑	↓	ns	ns	ns
<b>Eotaxin</b>	ns	↓	ns	ns	ns
<b>GM-CSF</b>	ns	↓	↓	↓	↓
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	↑	↓	↓	ns	↓
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	ns	ns	ns	↓	↓
<b>IL-2</b>	ns	↑	ns	ns	↓
<b>IL-4</b>	↑	ns	↓	↓	↓
<b>IL-3</b>	ns	↓	↓	↓	↓
<b>IL-5</b>	ns	↑	↑	↑	ns
<b>IL-6</b>	↑	↓	↓	↓	↓
<b>IL-7</b>	↓	ns	ns	↓	↓
<b>IL-9</b>	ns	ns	↓	ns	↓
<b>IL-10</b>	ns	↓	ns	ns	ns
<b>IL-12 (p40)</b>	ns	↓	↓	↓	↓
<b>IL-12 (p70)</b>	ns	ns	↓	ns	↓
<b>LIF</b>	ns	ns	↓	ns	↓
<b>IL-13</b>	ns	ns	↓	↓	↓

<b>LIX</b>	ns	ns	ns	ns	↑
<b>IL-15</b>	↓	↑	↓	↓	↓
<b>IL-17</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>IP-10</b>	↑	↑	ns	ns	ns
<b>KC</b>	↑	↓	↓	ns	ns
<b>MCP-1</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	↑	↑	ns	ns	↓
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	ns	↓	ns	ns	ns
<b>M-CSF</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>MIP-2</b>	ns	↓	↓	ns	↓
<b>MIG</b>	ns	ns	ns	↑	↑
<b>RANTES</b>	↓	↑	ns	↓	ns
<b>VEGF</b>	ns	↑	ns	↓	ns
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	ns	ns	ns	ns	↑

---

AIA: artrite induzida por antígeno; BARI: baricitinibe; DEXA: dexametasona; ETA: etanercepte; MTX: metotrexato; ↑: níveis aumentados; ↓: níveis reduzidos; ns: estatisticamente não significativo ( $p > 0,05$ ); Os camundongos AIA foram comparados aos controles, enquanto os camundongos tratados foram comparados aos camundongos AIA.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo corrobora o papel da molécula CD39 nas Treg do sangue periférico como biomarcador de resposta ao metotrexato em pacientes com AR. Demonstramos que uma alta expressão de CD39 em Treg isoladas a partir tanto do PBMC quanto do sangue total correlacionam-se com boa resposta ao tratamento com MTX, sendo o último método mais rápido, simples e barato, sendo assim a opção ideal para realização de um futuro *trial* clínico em maior escala. A análise da curva ROC apresenta uma área sob a curva de 0,7110 e  $p = 0,0425$ . Apesar de distante da acuraria de exames realizados no contexto de outras patologias, como as sorologias em pacientes com infecções virais, consideramos este resultado promissor quando se leva em consideração as diversas variáveis que podem interferir na resposta terapêutica na AR (ex. adesão terapêutica, mutações em genes responsáveis pela absorção e metabolismo do MTX, exercício físico, obesidade, tabagismo, perfil de autoanticorpos, dentre outros).

Apesar do gene FOXP3 ser o principal fator de transcrição responsável pela função imunorregulatória das Treg e, dessa forma, um importante marcador fenotípico desta população, diversos estudos demonstram que células CD4+CD25 apresentam função regulatória (SAKAGUCHI, 2008). Dessa forma, realizamos a análise da expressão do CD39 em células CD4+CD25+, porém o MFI de CD39 não se correlacionou com a resposta ao MTX, demonstrando assim a importância da marcação de FOXP3 para o kit. Adicionalmente, quando analisamos a equivalência do MFI de CD39 nas Treg CD4+CD25+ e Treg CD4+CD25+FOXP3+, observamos que, enquanto no PBMC ocorre uma correlação, esta se perde quando utilizamos sangue total. O processo de lise osmótica de hemácias (etapa necessária quando se utiliza sangue total, mas não quando se utiliza o PBMC) é um importante fator estressor que tem potencial de alterar as características fenotípicas dos leucócitos, podendo ser a responsável por essa divergência.

O nível de atividade da doença aparentemente não influencia nos níveis de CD39. Além disso, não observamos diferença na expressão de CD39 em relação a idade, sexo, tempo de início dos sintomas, tabagismo e status de autoanticorpos. Quando comparamos com controles pareados para idade e sexo, notamos que

pacientes com AR apresentam menor proporção de células Treg no sangue periférico, conforme já descrito por outros autores (AVDEEVA *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2021), e uma maior proporção de células TregCD39+, o que pode representar uma resposta fisiológica de tentativa de controle da inflamação. O MFI de CD39 nas TregCD39+, contudo, não se mostrou diferente.

Nos pacientes que falharam ao MTX, avaliamos se os níveis de CD39 correlacionam com as demais terapias. Quanto à leflunomida, não houve correlação. Contudo, respondedores ao anti-TNF apresentam níveis mais elevados de CD39. Vale ressaltar que se trata de um número muito reduzido de pacientes (6 TNF-NR) e não é possível concluir se os altos níveis de CD39 realmente contribuem (e o porquê) para uma melhor resposta ao anti-TNF.

Apesar do longo período de coleta realizado em um serviço de referência em reumatologia que abrange uma área de mais de 2 milhões de habitantes, o número de pacientes não atingiu a meta estipulada (120 pacientes). Certamente contribuiu para isto a pandemia do vírus SARS-CoV-2, que limitou acentuadamente o fluxo de pacientes virgens de tratamento, bem como rigorosos critérios de exclusão utilizados (muitos médicos da atenção primária iniciam corticoide empiricamente em pacientes com suspeita de doença reumática, sendo estes pacientes excluídos do estudo).

Outro fator limitante foi a elevada perda de pacientes ao longo do estudo, gerada principalmente pela ocorrência de eventos adversos ao metotrexato, má adesão terapêutica e problemas técnicos com a citometria de fluxo. Os dois primeiros fatores são intrínsecos ao desenho do estudo, porém o último poderá ser contornado em estudos futuros por meio de novas técnicas visando a padronização da citometria de fluxo em análises clínicas. Diversos fatores podem interferir na acurácia da medida do MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) em citometria, dentre eles o tempo entre coleta e processamento da amostra, tempo de preparo dos reagentes, características dos anticorpos (marca, isotipo, clone, tempo desde que foi aberto, diluição) e fluorocromos utilizados (comprimento de onda, índice de sobreposição com fluorocromos, intensidade do brilho, tandem), características do citômetro (validação para uso clínico, alinhamento, calibração, limpeza regular, superfície isenta de vibrações) e controles de qualidade (*beads* de calibração e compensação, controles *Fluorescence Minus One*, controles isotópicos) (MCKINNON, 2018; ROBINSON, 2022).

Pelas variáveis apresentadas, percebe-se que é um grande desafio o uso de citometria de fluxo para realizar ensaios clínicos prospectivos. Uma interessante estratégia utilizada no estudo IMI PRECISESADS foi a utilização de tubos pré-fabricados com os anticorpos (basta apenas adicionar a mostra para realizar a marcação, evitando erros de pipetagem e diluição), harmonização de citômetros por meio de *beads* específicas (VersaComp Capture beads, Beckman Coulter), utilização de *beads* específicas de 8 cores (Beckman Coulter) para controle diário de qualidade em cada citômetro, sistema de *gating* realizado de modo automático por meio de *Machine Learning* e intensidade dos marcadores corrigidos por um algoritmo específico utilizando Python (linguagem de programação utilizada em bioinformática) objetivando uma coeficiente de variação inter-instrumento menor que 5% (LE LANN *et al.*, 2020).

Como muitos dos pacientes com AR encaminhados ao nosso serviço encontravam-se em uso de corticoide iniciado empiricamente por médicos da atenção primária, resolvemos utilizar um modelo murino de artrite para avaliar o impacto da corticoterapia no fenótipo das Treg. Conforme apresentado na, a administração de dexametasona leva a uma redução da proporção de linfócitos T CD4, porém não interfere na proporção de células Treg CD4+CD25+FOXP3+, na proporção das células TregCD39+ e no MFI de CD39 nas TregCD39+. Curiosamente, camundongos com artrite induzida por antígeno (AIA) apresentam uma expansão das células Treg e aumento do MFI de CD39 nas TregCD39+, alteração esta que é revertida após o tratamento com dexametasona. O mesmo ocorre com o tratamento com MTX. Dessa forma, postulamos que a expansão das Treg e ao aumento do MFI de CD39 represente um mecanismo compensatório da inflamação induzida pelo antígeno, enquanto a redução deles decorre da regressão do processo inflamatório e é fármaco-independente.

Está bem documentado que o CD39 (juntamente com o CD73) são ectoenzimas essenciais do sistema purinérgico e são responsáveis pela defosforilação sequencial de ATP (pró-inflamatório) em adenosina (anti-inflamatório). Em condições de isquemia, onde ocorre a liberação de grandes quantidades de ATP no espaço extracelular, existe um aumento compensatório na expressão de CD39 e CD73 visando o *clearance* desta alarmina e aumento de adenosina, que possui ação anticoagulante e vasodilatadora (IDZKO; FERRARI; ELTZSCHIG, 2014). Dessa

forma, hipotetizamos que o aumento da densidade de CD39 em TregCD39+ possa ser um importante mecanismo de regulatório no modelo de artrite induzida por antígeno. Contudo, não é possível inferir que o mesmo ocorre em pacientes com AR, uma vez que Peres *et al.* não observaram mudança no MFI de CD39 nas TregsCD39+ antes e após o tratamento com MTX (PERES *et al.*, 2015) e no presente estudo não houve diferença no MFI de CD39 em pacientes com doença em moderada/alta atividade quando comparado a baixa atividade/remissão, e nem em pacientes com artrite reumatoide em atividade quando comparado com indivíduos saudáveis. Observamos, entretanto, que há um aumento significativamente estatístico na proporção das TregCD39+ em pacientes com artrite reumatoide quando comparados a indivíduos saudáveis, porém de baixa magnitude em termos quantitativos.

A busca de uma medicina de precisão no tratamento da AR não é algo recente (BACON; FARR, 1991; POOLE; DIEPPE, 1994), porém, até o presente momento, nenhum biomarcador é utilizado na prática clínica para guiar a terapia nesta doença. Diferentemente do câncer de mama e outras neoplasias onde diversos biomarcadores são levados em consideração na escolha da melhor opção terapêutica, a artrite reumatoide é uma doença de patogênese complexa, onde múltiplos fatores genéticos (mais de 100 loci genéticos estão associados a um maior risco da doença), ambientais, hábitos de vida, fatores hormonais e imunológicos se combinam para o desenvolvimento e progressão da doença (ALETAHA; SMOLEN, 2018; SMOLEN, J. S.; ALETAHA; MCINNES, 2016).

Cientes desse grande desafio, visando a criação de um algoritmo de resposta terapêutica ao MTX levando em consideração não apenas a expressão do CD39 nas Treg, dosamos 42 citocinas inflamatórias no plasma de 24 pacientes virgens de tratamento, encontrando níveis mais elevados de TGF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-17A em pacientes MTX-NR. Apesar da dosagem de citocinas ainda não ser realizada rotineiramente na maioria dos centros, estes resultados abrem a possibilidade para o desenvolvimento de um modelo multiparamétrico para a escolha do melhor tratamento inicial na AR. IFN- $\gamma$  e IL-17A são citocinas amplamente conhecidas na fisiopatologia da AR, estando relacionadas a uma resposta Th1 e Th17 respectivamente. TGF- $\alpha$ , por outro lado, tem sido pouco estudada no contexto desta doença. Trata-se de uma citocina da família dos fatores de crescimento epidermais (EGF, *epidermal growth factor*) com atividade angiogênica e carcinogênica (SCHMITT *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2018). Outros estudos

tentaram utilizar múltiplos biomarcadores séricos para predição de resposta ao MTX, porém sem sucesso (BROWN, P. M.; PRATT; ISAACS, 2016; LI *et al.*, 2013; LING; BLUETT; BARTON, 2018).

Quando comparados com indivíduos saudáveis, pacientes com AR apresentam elevados níveis plasmáticos mais elevados de FGF-2, G-CSF, GM-CSF, INF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-3, IL-12 P70, IL-17A, IL-1 $\alpha$ , IL-9, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e VEGF. FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) é a citocina com maior potencial angiogênico. Ela atua em fibroblastos por meio dos receptores FGFR (*fibroblast growth factor receptors*), levando a ativação e proliferação celular, com consequente expansão do *panus* sinovial. Além disso, induz osteoclastogênese e possivelmente está associada a erosões ósseas na AR (KONISTI; KIRIAKIDIS; PALEOLOG, 2006; ZHAO *et al.*, 2020). Níveis mais elevados de FGF-2 em pacientes com AR reforça o papel dos fibroblastos na doença. Considerados inicialmente como células de função meramente estrutural, hoje se sabe que os fibroblastos sinoviais são importante perpetuadores do processo inflamatório na sinóvia e estão diretamente relacionados com a AR de difícil controle (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; CROFT *et al.*, 2016). Por outro lado, a IL-10 é uma importante citocina imunossupressora, produzida principalmente por células Breg e Treg. Outros estudos corroboram que pacientes com AR possuem níveis mais elevados no plasma e no líquido sinovial, possivelmente como mecanismo compensatório buscando resolução da inflamação (CHEN *et al.*, 2019; CUSH *et al.*, 1995). As demais citocinas elevadas representam a ativação de células bem estabelecidas na AR: linfócitos (INF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-7, IL-9, IL-17A), macrófagos (MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), granulócitos (IL-5, IL-8) e células endoteliais (VEGF) (KONDO; KURODA; KOBAYASHI, 2021).

Curiosamente, o tratamento com MTX gerou uma redução dos níveis de IL-10, IL-17A, IL-7 e VEGF em MTX-R, mas não em MTX-UR. Enquanto a queda dos níveis de IL17A e VEGF possivelmente representa uma ação efetiva do MTX nas células produtoras destas citocinas (linfócitos Th17 e células estromais respectivamente), a redução dos níveis de IL-10 (citocina anti-inflamatória) potencialmente ocorre como reflexo do bom controle da doença e perda do estímulo inflamatório, uma vez que é produzida principalmente por células T e B ativadas. Em pacientes com psoríase, tanto o tratamento com metotrexato quanto com adalimumabe (anti-TNF) reduziram



de modo significativo os níveis séricos de IL-10, corroborando essa hipótese (ZDANOWSKA *et al.*, 2020).

O modelo AIA em camundongos foi utilizado para avaliar as mudanças fenotípicas das células T regulatórias com o tratamento com a dexametasona (corticoide) e MTX. Observamos que ambos os tratamentos foram eficazes na redução da dor e edema articular. O uso do corticoide isoladamente não interferiu na MFI de CD39 nas Treg, o que sugere que em estudos futuros, pacientes em uso dessa classe de medicamentos possam ser incluídos na análise.

A indução da artrite nesse modelo foi associada a um aumento no MFI de CD39 nas Treg e tanto o tratamento com MTX quanto com dexametasona reduziram para níveis comparáveis aos camundongos controle. Apesar de não observarmos um fenótipo semelhante em humanos (o nível de atividade da doença não interfere na expressão de CD39 e indivíduos saudáveis possuem MFI de CD39 semelhante a pacientes com AR), o modelo animal possui inquestionável vantagem em termos de homogeneidade do processo inflamatório. Dessa forma, análises futuras com número amostral maior são necessárias para avaliar a dinâmica da expressão do CD39 nas Treg em pacientes com AR.

Realizamos uma análise multiplex de 32 citocinas inflamatórias no soro de camundongos tratados com dexametasona, metotrexato, etanercepte e baricitinibe. Não é possível tecer uma comparação direta entre os tratamentos, uma vez a dose utilizada foi definida a partir de artigos avaliando a resposta imunossupressora dessas medicações em diversos contextos de doenças autoimunes e não necessariamente representa o equivalente do tratamento humano para AR. Não obstante, é interessante notar que os quatro tratamentos reduziram os níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-6 e IL-12. Enquanto a IL-1 e IL-6 são clássicas citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da AR, a IL-3 atua como uma “pan” fator de crescimento, influenciando precursores hematopoiéticos das mais diferentes linhagens (desde basófilos e mastócitos até plaquetas células dendríticas) (DOUGAN; DRANOFF; DOUGAN, 2019). Já a IL-12 é uma citocina que atua como ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo, uma vez que é produzida por células apresentadoras de antígeno e induz a diferenciação de células Th0 em células Th1. Apesar de claramente importante nas espondiloartropatias (o bloqueio do eixo IL-12/IL-23 faz parte do arsenal terapêutico deste grupo de doenças), seu papel na artrite reumatoide está menos esclarecido. Os

níveis séricos e sinoviais esta citocina se correlacionam os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 em paciente com AR, além de correlacionar positivamente com os scores de atividade da doença (KIM *et al.*, 2000). Os macrófagos sinoviais M1 são os principais produtores desta citocina no ambiente sinovial, contribuindo para a polarização CD4+Th1 e Th17 (CUTOLO *et al.*, 2022), porém possivelmente não possui papel decisivo na progressão na doença, uma vez que o ustekinumabe (anticorpo monoclonal contra a subunidade p40 da IL-12 e IL-23) não demonstrou eficácia no tratamento da AR (SMOLEN *et al.*, 2017).

Curiosamente, os tratamentos com MTX, etanercepte e dexametasona aumentaram os níveis de IL-5, citocina produzida por linfócitos e que atua como fator de crescimento e ativador de eosinófilos. É crescente o corpo de evidências que sugere que estas células desempenham um papel importante na resolução da inflamação. Pacientes com artrite autolimitada possuem maiores níveis séricos de IL-5 e eotaxina (quimiocina de eosinófilos), enquanto em modelos murinos de artrite a elevação de IL-5 marca o início da resolução da inflamação (CHEN *et al.*, 2019). Dessa forma, a modulação dos eosinófilos tem o potencial de ser um novo mecanismo de tratamento na AR, particularmente nas fases iniciais. Até o presente momento, ainda não existem biológicos agonísticos da IL-5.

De modo inesperado, o tratamento com baricitinibe gerou um aumento dos níveis séricos do TNF- $\alpha$ , e que tanto o tratamento com etanercepte quanto com baricitinibe geraram um aumento nos níveis séricos de MIG (*monokine induced by gamma interferon*, também conhecida como CXCL9). Esta última citocina tem perfil Th1 se liga ao receptor CXCR3, atuando atraindo macrófagos, linfócitos e células NK. Estudos demonstram níveis mais elevados de MIG no plasma e líquido sinovial de pacientes com AR quando comparados a pacientes com osteoartrite (PAPARO, 2019; PATEL; ZACHARIAH; WHICHARD, 2001). Além disso, os níveis plasmáticos desta quimiocina correlacionam-se com atividade da doença e progressão radiográfica da doença (KUAN *et al.*, 2010). Estes achados contraditórios quanto ao TNF- $\alpha$  e MIG sugerem uma divergência entre a patogênese AR e inflamação gerada neste modelo murino, bem como a forma que estas medicações atuam controlando a inflamação.

## 6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, demonstramos que a menor expressão de CD39 em Treg de pacientes com AR está associada a falha terapêutica ao MTX. Validamos o uso de Treg isoladas não apenas do PBMC, mas também do ST (método mais simples e custo-efetivo), solidificando as bases de um futuro ensaio clínico multicêntrico para o desenvolvimento de um kit capaz de auxiliar o tratamento da AR. Demonstramos que o CD39 nas Treg não sofre variações de acordo com o nível de atividade da doença, tabagismo, sexo, idade ou status de autoanticorpos. Buscando identificar possíveis novos marcadores de resposta terapêutica, dosamos 42 citocinas inflamatórias no plasma dos pacientes ao diagnóstico, observando que altos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-17 e TGF- $\alpha$  também estão associados a falha ao MTX. Utilizando um modelo de artrite experimental, constatamos que o tratamento com corticoide não altera os níveis de CD39 em animais saudáveis, porém verificamos que as TregCD39+ se comportam de modo dinâmico, aumentando o MFI de CD39 durante a artrite e voltando a valores normais após o tratamento imunossupressor. Por fim, demonstramos em modelo experimental que tratamentos com drogas de diferentes mecanismos de ação modulam citocinas plasmáticas de modo altamente distinto, gerando novos *insights* para a utilização de modelos animais em estudos farmacológicos na artrite reumatoide.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKAYA, B. *et al.* Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. **Nature immunology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 218–231, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41590-018-0280-2>. Acesso em: 10 mar. 2022.
- AL-MOUSAWI, A. M. *et al.* Impact of anesthesia, analgesia, and euthanasia technique on the inflammatory cytokine profile in a rodent model of severe burn injury. **Shock (Augusta, Ga.)**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 261–268, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1097/SHK.0B013E3181D8E2A6>. Acesso em: 20 fev. 2022.
- ALETAHA, D. *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 69, n. 9, p. 1580–1588, 2010a. Available at: <https://doi.org/10.1136/ARD.2010.138461>. Acesso em: 21 fev. 2022.
- ALETAHA, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 2569–2581, 2010b. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.27584>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- ALETAHA, D. *et al.* Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 2625–2636, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.21235>. Acesso em: 21 fev. 2022.
- ALETAHA, D.; SMOLEN, J. S. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 320, n. 13, p. 1360–1372, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.13103>
- ARJOMANDNEJAD, M.; KOPEC, A. L.; KEELER, A. M. CAR-T Regulatory (CAR-Treg) Cells: Engineering and Applications. **Biomedicines**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2022. Available at: <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10020287>. Acesso em: 28 mar. 2022.
- ARLEEVSKAYA, M. I. *et al.* Toll-Like Receptors, Infections, and Rheumatoid Arthritis. **Clinical reviews in allergy & immunology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 172–181, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/S12016-019-08742-Z>. Acesso em: 23 fev. 2022.
- ARMAS-GONZÁLEZ, E. *et al.* Role of CXCL13 and CCL20 in the recruitment of B cells to inflammatory foci in chronic arthritis. **Arthritis research & therapy**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13075-018-1611-2>. Acesso em: 2 mar. 2022.
- AUNGIER, S. R. *et al.* Targeting early changes in the synovial microenvironment: A new class of immunomodulatory therapy? **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 186–191, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214294>
- AVDEEVA, A. *et al.* Regulatory T cells in patients with early untreated rheumatoid arthritis: Phenotypic changes in the course of methotrexate treatment. **Biochimie**, [s. l.], v. 174, p. 9–17, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.03.014>
- BACON, P. A.; FARR, M. Assessment of rheumatoid arthritis. **Current opinion in rheumatology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 421–428, 1991. Available at: <https://doi.org/10.1097/00002281-199106000-00014>. Acesso em: 5 maio 2023.
- BAGGOTT, J. E.; VAUGHN, W. H.; HUDSON, B. B. Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. **The Biochemical journal**, [s. l.], v. 236, n. 1, p. 193–200, 1986. Available at:

<https://doi.org/10.1042/BJ2360193>. Acesso em: 4 abr. 2022.

BENDELE, A. *et al.* Animal models of arthritis: Relevance to human disease. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 134–142, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1177/019262339902700125>

BENHAM, H. *et al.* Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 7, n. 290, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAA9301>. Acesso em: 25 mar. 2022.

BENNETT, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nature genetics**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 20–21, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1038/83713>. Acesso em: 8 mar. 2022.

BLACK, R. L. *et al.* Methotrexate Therapy in Psoriatic Arthritis: Double-Blind Study on 21 Patients. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 189, n. 10, p. 743–747, 1964. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.1964.03070100037007>. Acesso em: 28 mar. 2022.

BLUESTONE, J. A. *et al.* Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 7, n. 315, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAD4134>. Acesso em: 24 mar. 2022.

BONELLI, M.; SMOLEN, J. S.; SCHEINECKER, C. Treg and lupus. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 69 Suppl 1, n. SUPPL. 1, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1136/ARD.2009.117135>. Acesso em: 18 mar. 2022.

BONORA, M. *et al.* ATP synthesis and storage. **Purinergic signalling**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 343–357, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11302-012-9305-8>. Acesso em: 12 abr. 2022.

BOREA, P. A. *et al.* Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. xx, p. 1–16, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.02.006>

BOTTINI, N.; FIRESTEIN, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 24–33, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.190>

BRACKERTZ, D.; MITCHELL, G. F.; MACKAY, I. R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 841–850, 1977. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.1780200314>. Acesso em: 20 fev. 2022.

BROWN, J. H. *et al.* Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, [s. l.], v. 364, n. 6432, p. 33–39, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1038/364033A0>. Acesso em: 2 mar. 2022.

BROWN, P. M.; PRATT, A. G.; ISAACS, J. D. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.175>

BRUNKOW, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature genetics**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 68–73, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1038/83784>. Acesso em: 8 mar. 2022.

BUCH, M. H.; EYRE, S.; MCGONAGLE, D. Persistent inflammatory and non-inflammatory mechanisms in refractory rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 17–33, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00541-7>

BUCKLEY, C. D. *et al.* Location, location, location: how the tissue microenvironment affects inflammation in RA. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 195–212, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00570-2>

- BUCKLEY, C. D. *et al.* Stromal Cells in Chronic Inflammation and Tertiary Lymphoid Organ Formation. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 715–745, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120252>
- CAO, D. *et al.* CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. **Arthritis research & therapy**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. R335, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1186/AR1192>. Acesso em: 21 mar. 2022.
- CHAUDHRY, A. *et al.* CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 326, n. 5955, p. 986–991, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1172702>. Acesso em: 9 mar. 2022.
- CHEN, Z. *et al.* Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 9–17, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0109-2>
- CHINEN, T. *et al.* An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. **Nature immunology**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 1322–1333, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/NI.3540>. Acesso em: 10 mar. 2022.
- CHOUDHARY, N.; BHATT, L. K.; PRABHAVALKAR, K. S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 193–200, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1434793>
- CICERO, L. *et al.* Anesthesia protocols in laboratory animals used for scientific purposes. **Acta bio-medica : Atenei Parmensis**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 337–342, 2018. Available at: <https://doi.org/10.23750/ABM.V89I3.5824>. Acesso em: 21 fev. 2022.
- CONITEC. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Artrite Reumatóide** Ministério da Saúde. [S. l.: s. n.], 2019.
- COOPER, G. S.; BYNUM, M. L. K.; SOMERS, E. C. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. **Journal of autoimmunity**, [s. l.], v. 33, n. 3–4, p. 197–207, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2009.09.008>. Acesso em: 17 mar. 2022.
- CORBACHO, M. I.; DAPUETO, J. J. Avaliação da capacidade funcional e da qualidade de vida de pacientes com artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 31–43, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000100004>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- CROFT, A. P. *et al.* Rheumatoid synovial fibroblasts differentiate into distinct subsets in the presence of cytokines and cartilage. **Arthritis Research and Therapy**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1156-1>
- CRONSTEIN, B. N.; AUNE, T. M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 145–154, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0373-9>. Acesso em: 8 mar. 2022.
- CRONSTEIN, B. N.; SITKOVSKY, M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. **Nat Rev Immunol**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 917–922, 2017. Available at: <https://doi.org/10.2174/092986708783955392>
- CUSH, J. J. *et al.* Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 96–104, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.1780380115>. Acesso em: 16 maio 2023.
- CUTOLO, M. *et al.* The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 13, 2022. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.867260>. Acesso em: 13 jul. 2023.

DANIKOWSKI, K. M.; JAYARAMAN, S.; PRABHAKAR, B. S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. **Journal of neuroinflammation**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/S12974-017-0892-8>. Acesso em: 18 mar. 2022.

DAVEAU, M. *et al.* Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted? [s. l.], n. May, p. 1021–1028, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep112>

DAVIDSON, A.; DIAMOND, B. Autoimmune diseases. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 345, n. 5, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM200108023450506>. Acesso em: 18 mar. 2022.

DE RYCKE, L. *et al.* Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. 1587–1593, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1136/ARD.2003.017574>. Acesso em: 28 fev. 2022.

DE RYCKE, Leen *et al.* Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 52, n. 8, p. 2323–2330, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.21220>. Acesso em: 28 fev. 2022.

DEAGLIO, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 204, n. 6, p. 1257–1265, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>

DEDMON, L. E. The genetics of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, [s. l.], v. 59, n. 10, p. 2661–2670, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAA232>. Acesso em: 2 mar. 2022.

DONATE, P. B. *et al.* Cigarette smoke induces miR-132 in Th17 cells that enhance osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 118, n. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.2017120118>. Acesso em: 22 fev. 2022.

DONG, C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 39, p. 51–76, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053702>

DONG, S. *et al.* The effect of low-dose IL-2 and Treg adoptive cell therapy in patients with type 1 diabetes. **JCI insight**, [s. l.], v. 6, n. 18, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.147474>. Acesso em: 24 mar. 2022.

DÖRNER, T. *et al.* Rheumatoid factor revisited. **Current opinion in rheumatology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 246–253, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1097/00002281-200405000-00013>. Acesso em: 1 mar. 2022.

DOUGAN, M.; DRANOFF, G.; DOUGAN, S. K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. **Immunity**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 796–811, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2019.03.022>. Acesso em: 5 jun. 2023.

DUGGLEBY, R. *et al.* Clinical grade regulatory CD4+ T cells (Tregs): Moving toward cellular-based immunomodulatory therapies. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. FEB, p. 1–13, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00252>

DUQUESNOY, R. J.; TRUCCO, M. Genetic basis of cell surface polymorphisms encoded by the major histocompatibility complex in humans. **Critical reviews in immunology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 103–145, 1988. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3276444/>. Acesso em: 2 mar. 2022.

EBRINGER, A.; WILSON, C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. **Journal of medical microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 305–311, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49->

4-305. Acesso em: 23 fev. 2022.

EDWARDS, J. C. W.; CAMBRIDGE, G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. **Rheumatology (Oxford, England)**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 205–211, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/40.2.205>. Acesso em: 7 mar. 2022.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 367, n. 24, p. 2322–2333, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205750>

ERNST, P. B.; GARRISON, J. C.; THOMPSON, L. F. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 185, n. 4, p. 1993–1998, 2010. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1000108>. Acesso em: 10 mar. 2022.

EYRE, S. *et al.* High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. **Nature genetics**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 1336–1340, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1038/NG.2462>. Acesso em: 22 fev. 2022.

FANG, Q.; ZHOU, C.; NANDAKUMAR, K. S. Molecular and Cellular Pathways Contributing to Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. **Mediators of inflammation**, [s. l.], v. 2020, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1155/2020/3830212>. Acesso em: 2 mar. 2022.

FARBER, S. *et al.* Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 238, n. 23, p. 787–793, 1948. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM194806032382301>. Acesso em: 28 mar. 2022.

FEARON, U. *et al.* Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. **Nature reviews. Rheumatology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 385–397, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2016.69>. Acesso em: 2 mar. 2022.

FELDMANN, M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 364–371, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRI802>. Acesso em: 7 mar. 2022.

FEUERER, M. *et al.* Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 13, p. 5919–5924, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1002006107>. Acesso em: 25 mar. 2022.

FIGUS, F. A. *et al.* Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. **Autoimmunity reviews**, [s. l.], v. 20, n. 4, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2021.102776>. Acesso em: 11 set. 2023.

FILER, A. *et al.* Identification of a transitional fibroblast function in very early rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 76, n. 12, p. 2105–2112, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211286>

FINZEL, S. *et al.* Comparison of the effects of tocilizumab monotherapy and adalimumab in combination with methotrexate on bone erosion repair in rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 78, n. 9, p. 1186–1191, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2018-214894>. Acesso em: 7 mar. 2022.

FIRESTEIN, G. S. *et al.* **Kelley's textbook of rheumatology**. 9th. ed. [S. l.: s. n.], 2012. v. 1

FLEISCHMANN, R. *et al.* Efficacy and safety of tofacitinib monotherapy, tofacitinib with methotrexate, and adalimumab with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis (ORAL Strategy): a phase 3b/4, double-blind, head-to-head, randomised controlled trial. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v.



390, n. 10093, p. 457–468, 2017. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31618-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31618-5). Acesso em: 7 mar. 2022.

FLEISCHMANN, R. *et al.* Upadacitinib Versus Placebo or Adalimumab in Patients With Rheumatoid Arthritis and an Inadequate Response to Methotrexate: Results of a Phase III, Double-Blind, Randomized Controlled Trial. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, [s. l.], v. 71, n. 11, p. 1788–1800, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.41032>. Acesso em: 7 mar. 2022.

FRAENKEL, L. *et al.* 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Care and Research**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–16, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1002/acr.24596>

FRISELL, T. *et al.* Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 65, n. 11, p. 2773–2782, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.38097>. Acesso em: 22 fev. 2022.

GIANCIECCHI, E.; FIERABRACCI, A. Inhibitory Receptors and Pathways of Lymphocytes: The Role of PD-1 in Treg Development and Their Involvement in Autoimmunity Onset and Cancer Progression. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 9, n. OCT, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02374>. Acesso em: 10 mar. 2022.

GLIWÍŃSKI, M. *et al.* Therapy with CD4 + CD25 + T regulatory cells – should we be afraid of cancer? **Wspolczesna Onkologia**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–6, 2019. Available at: <https://doi.org/10.5114/wo.2019.84110>

GOLDMAN, I. D.; MATHERLY, L. H. The cellular pharmacology of methotrexate. **Pharmacology & therapeutics**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 77–102, 1985. Available at: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(85\)90083-X](https://doi.org/10.1016/0163-7258(85)90083-X). Acesso em: 4 abr. 2022.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 1205–1213, 1987. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.1780301102>. Acesso em: 22 fev. 2022.

GRINNELL, S.; YOSHIDA, K.; JASIN, H. E. Responses of lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis to IgG modified by oxygen radicals or peroxyntirite. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 80–83, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.20760>. Acesso em: 1 mar. 2022.

GUBNER, R.; AUGUST, S.; GINSBERG, V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. **The American journal of the medical sciences**, [s. l.], v. 221, n. 2, p. 176–182, 1951. Available at: <https://doi.org/10.1097/0000441-195102000-00009>. Acesso em: 28 mar. 2022.

HAN, G. M. *et al.* CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. **Cellular immunology**, [s. l.], v. 253, n. 1–2, p. 92–101, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2008.05.007>. Acesso em: 21 mar. 2022.

HARRE, U. *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 122, n. 5, p. 1791–1802, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI60975>. Acesso em: 1 mar. 2022.

HASKÓ, G. *et al.* Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 759–770, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd2638>

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Infection and rheumatoid arthritis: still an open question. **Current opinion in rheumatology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 352–357, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1097/BOR.0B013E3283477B7B>. Acesso em: 23 fev. 2022.

- HOFFMEISTER, R. T. Methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: 15 years experience. **The American journal of medicine**, [s. l.], v. 75, n. 6A, p. 69–73, 1983. Available at: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)90477-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)90477-1). Acesso em: 28 mar. 2022.
- HRESKO, A.; LIN, T. C.; SOLOMON, D. H. Medical Care Costs Associated With Rheumatoid Arthritis in the US: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. **Arthritis care & research**, [s. l.], v. 70, n. 10, p. 1431–1438, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/ACR.23512>. Acesso em: 23 abr. 2022.
- HSIEH, P. H. *et al.* Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review of literature in biologic era. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. S771–S777, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2019-216243>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- HUMBY, F. *et al.* Synovial cellular and molecular signatures stratify clinical response to csDMARD therapy and predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis patients. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 761–772, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214539>
- IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**, [s. l.], v. 509, n. 7500, p. 310–317, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13085>
- INOUE, K.; YUASA, H. Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 12–19, 2014. Available at: <https://doi.org/10.2133/DMPK.DMPK-13-RV-119>. Acesso em: 28 mar. 2022.
- JIANG, Q. *et al.* Function and Role of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. April, p. 1–12, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626193>. Acesso em: 18 mar. 2022.
- JORDAN, M. S. *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **Nature immunology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 301–306, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1038/86302>. Acesso em: 9 mar. 2022.
- JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology** 2011 11:3, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 201–212, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2938>. Acesso em: 8 mar. 2022.
- KAROOUZAKIS, E. *et al.* DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 3613–3622, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.25018>. Acesso em: 19 abr. 2022.
- KAWASHIRI, S. Y. *et al.* CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 2517–2521, 2011. Available at: <https://doi.org/10.3899/JRHEUM.110283>. Acesso em: 21 mar. 2022.
- KHANDPUR, R. *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 5, n. 178, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3005580>. Acesso em: 2 mar. 2022.
- KIM, W. U. *et al.* The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). **Clinical and experimental immunology**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 175–181, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.2000.01095.X>. Acesso em: 13 jul. 2023.
- KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **European journal of immunology**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 1830–1835, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1002/EJ.201040391>. Acesso em: 21 mar. 2022.
- KLARESKOG, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 38–46, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.21575>.

Acesso em: 23 fev. 2022.

KOBIE, J. J. *et al.* T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 177, n. 10, p. 6780–6786, 2006. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6780>

KONDO, N.; KURODA, T.; KOBAYASHI, D. Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, 10922, n. 20, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS222010922>. Acesso em: 5 maio 2023.

KONISTI, S.; KIRIAKIDIS, S.; PALEOLOG, E. M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Histology and histopathology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 339–365, 2006. Available at: <https://doi.org/10.14670/HH-21.557>. Acesso em: 15 maio 2023.

KOONPAEW, S. *et al.* LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 203, n. 1, p. 119–129, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1084/JEM.20050903>. Acesso em: 9 mar. 2022.

KREMER, J. M. *et al.* Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 832–835, 1986. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.1780290703>. Acesso em: 28 mar. 2022.

KRENSKY, A. M. The HLA system, antigen processing and presentation. **Kidney international. Supplement**, [s. l.], v. 58, n. 58, 1997. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9067934/>. Acesso em: 2 mar. 2022.

KUAN, W. P. *et al.* CXCL 9 and CXCL 10 as Sensitive markers of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 257–264, 2010. Available at: <https://doi.org/10.3899/JRHEUM.090769>. Acesso em: 17 jul. 2023.

LAI, N. L. *et al.* The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Ankylosing Spondylitis: A Meta-Analysis. **Journal of immunology research**, [s. l.], v. 2019, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/1058738>. Acesso em: 18 mar. 2022.

LE LANN, L. *et al.* Standardization procedure for flow cytometry data harmonization in prospective multicenter studies. **Scientific reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-020-68468-3>. Acesso em: 5 maio 2023.

LEE, E. J. *et al.* Brief-duration high-intensity chemotherapy for patients with small noncleaved-cell lymphoma or FAB L3 acute lymphocytic leukemia: results of cancer and leukemia group B study 9251. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 20, p. 4014–4022, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.20.4014>. Acesso em: 4 abr. 2022.

LEE, J. *et al.* Baricitinib Attenuates Autoimmune Phenotype and Podocyte Injury in a Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. August, p. 1–11, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.704526>

LEONARD, W. J. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. **International journal of hematology**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 271–277, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02981951>. Acesso em: 7 mar. 2022.

LEVINE, A. G. *et al.* Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. **Nature**, [s. l.], v. 546, n. 7658, p. 421–425, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE22360>. Acesso em: 10 mar. 2022.

LEWIS, M. J. *et al.* Molecular Portraits of Early Rheumatoid Arthritis Identify Clinical and Treatment Response Phenotypes. **Cell reports**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 2455-2470.e5, 2019. Available at:

<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.07.091>. Acesso em: 12 abr. 2022.

LI, W. *et al.* Impact of a multi-biomarker disease activity test on rheumatoid arthritis treatment decisions and therapy use. **Current Medical Research and Opinion**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 85–92, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1185/03007995.2012.753042>

LING, S.; BLUETT, J.; BARTON, A. Prediction of response to methotrexate in rheumatoid arthritis. **Expert Review of Clinical Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 419–429, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1465409>

LIU, M. F. *et al.* The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Scandinavian journal of immunology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 312–317, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1365-3083.2005.01656.X>. Acesso em: 21 mar. 2022.

LLOPIS, E. *et al.* Conventional Radiology in Rheumatoid Arthritis. **Radiologic clinics of North America**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 917–941, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.RCL.2017.04.002>. Acesso em: 11 set. 2023.

LUCA ANTONIOLI, PAL PACHER, E. SYLVESTER VIZI, G. H. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 355–367, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>

LUEDDERS, B. A. *et al.* Predictive ability, validity, and responsiveness of the multi-biomarker disease activity score in patients with rheumatoid arthritis initiating methotrexate. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 1058–1063, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2020.05.019>

M STEWART, V MALKOVSKA, J KRISHNAN, L LESSIN, W. B. Lymphoma in a patient with rheumatoid arthritis receiving methotrexate treatment: successful treatment with rituximab. **Ann Rheum Dis**, [s. l.], v. 60, n. 9, p. 892–893, 2001.

M UESUGI, T HAYASHI, H. E. J. Covalent cross-linking of immune complexes by oxygen radicals and nitrite. **J Immunol**, [s. l.], v. 1, n. 161(3), p. 1422–1427, 1998. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9686606/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

MANNINO, M. H. *et al.* The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer letters**, [s. l.], v. 367, n. 2, p. 103–107, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2015.07.009>. Acesso em: 9 mar. 2022.

MARTIKAINEN, J. A. *et al.* Longterm Work Productivity Costs Due to Absenteeism and Permanent Work Disability in Patients with Early Rheumatoid Arthritis: A Nationwide Register Study of 7831 Patients. **The Journal of rheumatology**, [s. l.], v. 43, n. 12, p. 2101–2105, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3899/JRHEUM.160103>. Acesso em: 22 fev. 2022.

MASKA, L.; ANDERSON, J.; MICHAUD, K. Measures of functional status and quality of life in rheumatoid arthritis: Health Assessment Questionnaire Disability Index (HAQ), Modified Health Assessment Questionnaire (MHAQ), Multidimensional Health Assessment Questionnaire (MDHAQ), Health Assessment Questionnaire II (HAQ-II), Improved Health Assessment Questionnaire (Improved HAQ), and Rheumatoid Arthritis Quality of Life (RAQoL). **Arthritis care & research**, [s. l.], v. 63 Suppl 11, n. SUPPL. 11, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1002/ACR.20620>. Acesso em: 21 fev. 2022.

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. **Current protocols in immunology**, [s. l.], v. 120, p. 5.1.1-5.1.11, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/CPIM.40>. Acesso em: 5 maio 2023.

MEGA, T. P. **Cenário pós-incorporação de medicamentos biológicos para artrite reumatoide disponibilizados pelo componente especializado da assistência farmacêutica no SUS**. 1–86 f. 2019. [s. l.], 2019. Available at: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/39715>

MEURER, F. *et al.* Standard Gibbs energy of metabolic reactions: II. Glucose-6-phosphatase reaction

and ATP hydrolysis. **Biophysical chemistry**, [s. l.], v. 223, p. 30–38, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2017.02.005>. Acesso em: 12 abr. 2022.

MIKKELSEN, T. S. *et al.* PharmGKB summary: methotrexate pathway. **Pharmacogenetics and genomics**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 679–686, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1097/FPC.0B013E328343DD93>. Acesso em: 28 mar. 2022.

MIKULS, T. R. *et al.* Porphyromonas gingivalis and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 64, n. 11, p. 3522–3530, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.34595>. Acesso em: 23 fev. 2022.

MILLER, S. L.; UREY, H. C. Organic compound synthesis on the primitive earth. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 130, n. 3370, p. 245–251, 1959. Available at: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.130.3370.245>. Acesso em: 12 abr. 2022.

MOESTA, A. K.; LI, X. Y.; SMYTH, M. J. Targeting CD39 in cancer. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 739–755, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0376-4>

MORGAN, M. E. *et al.* CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 1452–1460, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.11063>. Acesso em: 21 mar. 2022.

MORGAN, M. E. *et al.* Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 52, n. 7, p. 2212–2221, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.21195>. Acesso em: 21 mar. 2022.

MORIKAWA, M.; DERYNCK, R.; MIYAZONO, K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 8, n. 5, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A021873>. Acesso em: 9 mar. 2022.

MÖTTÖNEN, M. *et al.* CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and experimental immunology**, [s. l.], v. 140, n. 2, p. 360–367, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2005.02754.X>. Acesso em: 21 mar. 2022.

NG, L. G.; MACKAY, C. R.; MACKAY, F. The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes. **Molecular immunology**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 763–772, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2004.06.041>. Acesso em: 2 mar. 2022.

NIELEN, M. M. J. *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 380–386, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.20018>. Acesso em: 28 fev. 2022.

NISHIMURA, K. *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. **Annals of internal medicine**, [s. l.], v. 146, n. 11, p. 797–808, 2007. Available at: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-146-11-200706050-00008>. Acesso em: 28 fev. 2022.

NIU, Q. *et al.* Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology international**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 2731–2736, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00296-011-1984-X>. Acesso em: 21 mar. 2022.

NUSSBAUM, L.; CHEN, Y. L.; OGG, G. S. Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. **The British journal of dermatology**, [s. l.], v. 184, n. 1, p. 14–24, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1111/BJD.19380>. Acesso em: 18 mar. 2022.

O'NEIL, L. J.; KAPLAN, M. J. Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance and Fueling Disease. **Trends in molecular medicine**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 215–227, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2018.12.008>. Acesso em: 2 mar. 2022.

OKADA, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. **Nature**, [s. l.], v. 506, n. 7488, p. 376–381, 2014a. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE12873>. Acesso em: 22 fev. 2022.

OKADA, Y. *et al.* Risk for ACPA-positive rheumatoid arthritis is driven by shared HLA amino acid polymorphisms in Asian and European populations. **Human molecular genetics**, [s. l.], v. 23, n. 25, p. 6916–6926, 2014b. Available at: <https://doi.org/10.1093/HMG/DDU387>. Acesso em: 28 fev. 2022.

OLIVEIRA, R. D. R. *et al.* Differential gene expression profiles may differentiate responder and nonresponder patients with rheumatoid arthritis for methotrexate (MTX) monotherapy and MTX plus tumor necrosis factor inhibitor combined therapy. **The Journal of rheumatology**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 1524–1532, 2012. Available at: <https://doi.org/10.3899/JRHEUM.120092>. Acesso em: 22 fev. 2022.

OLIVEIRA, S. R. *et al.* Are neutrophil extracellular traps the link for the cross-talk between periodontitis and rheumatoid arthritis physiopathology? **Rheumatology (Oxford, England)**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 174–184, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAB289>. Acesso em: 22 fev. 2022.

PACHOLCZYK, R. *et al.* Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. **Immunity**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 249–259, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2006.05.016>. Acesso em: 9 mar. 2022.

PAPARO, S. R. Rheumatoid arthritis and the Th1 chemokine MIG. **La Clinica terapeutica**, [s. l.], v. 170, n. 6, p. E472–E477, 2019. Available at: <https://doi.org/10.7417/CT.2019.2178>. Acesso em: 17 jul. 2023.

PATEL, D. D.; ZACHARIAH, J. P.; WHICHARD, L. P. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 39–45, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1006/CLIM.2000.4957>. Acesso em: 17 jul. 2023.

PERES, R. S. *et al.* Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 112, n. 8, p. 2509–2514, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1424792112>

PIANTA, A. *et al.* Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 127, n. 8, p. 2946–2956, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI93450>. Acesso em: 22 fev. 2022.

PINHEIRO, G. da R. C. Instrumentos de medida da atividade da artrite reumatóide: por que e como Empregá-los. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 362–365, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042007000500011>. Acesso em: 21 fev. 2022.

PINTO, L. G. *et al.* Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 $\beta$  production. **Arthritis Research and Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–13, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0759-2>

POOLE, A. R.; DIEPPE, P. Biological markers in rheumatoid arthritis. **Seminars in arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 23, n. 6 Suppl 2, p. 17–31, 1994. Available at: [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0049-0172(94)90081-7). Acesso em: 5 maio 2023.

PREVOO, M. *et al.* Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, [s. l.], v. 38, p. 44–48, 1995.

RADNER, H.; ALETAHA, D. Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. **Wiener medizinische Wochenschrift (1946)**, [s. l.], v. 165, n. 1–2, p. 3–9, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10354-015-0344-Y>. Acesso em: 7 mar. 2022.

RAVANI, A. *et al.* Role and function of A2A and A3 adenosine receptors in patients with ankylosing

spondylitis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 1–15, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18040697>

RAYCHAUDHURI, S. *et al.* Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. **Nature genetics**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 291–296, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1038/NG.1076>. Acesso em: 22 fev. 2022.

ROBINSON, J. P. Flow cytometry: past and future. **BioTechniques**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 159–169, 2022. Available at: <https://doi.org/10.2144/BTN-2022-0005>. Acesso em: 5 maio 2023.

ROWSHANRAVAN, B.; HALLIDAY, N.; SANSOM, D. M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. **Blood**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 58–67, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-06-741033>. Acesso em: 7 mar. 2022.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 155, n. 3, p. 1151–1164, 1995. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7636184/>. Acesso em: 8 mar. 2022.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, [s. l.], v. 133, n. 5, p. 775–787, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>

SAMSON, M. *et al.* Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 64, n. 8, p. 2499–2503, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.34477>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SHELLEKENS, G. A. *et al.* Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 273–281, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI1316>. Acesso em: 28 fev. 2022.

SCHER, J. U. *et al.* Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **eLife**, [s. l.], v. 2013, n. 2, 2013. Available at: <https://doi.org/10.7554/ELIFE.01202.001>. Acesso em: 23 fev. 2022.

SCHER, J. U. *et al.* Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 64, n. 10, p. 3083–3094, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.34539>. Acesso em: 23 fev. 2022.

SCHMITT, F. C. *et al.* TGF-alpha and angiogenesis. **The American journal of surgical pathology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 358–359, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1097/0000478-199903000-00023>. Acesso em: 7 set. 2023.

SCHNEIDER, A. H. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate joint hyperalgesia induced by immune inflammation. **Rheumatology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 3461–3473, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa794>

SCHNEIDER, P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. **Current opinion in immunology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 282–289, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COI.2005.04.005>. Acesso em: 2 mar. 2022.

SCHWARTZ, D. M. *et al.* Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 25–36, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.167>

SCOTT, L. J. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. **Drugs**, [s. l.], v. 77, n. 17, p. 1865–1879, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1007/S40265-017-0829-7>. Acesso em: 7 mar. 2022.

SHANAJ, S.; DONLIN, L. T. Synovial Tissue: Cellular and Molecular Phenotyping. **Current Rheumatology Reports**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1–6, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11926-019-0858-1>

- SHARABI, A. *et al.* Regulatory T cells in the treatment of disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 823–844, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.148>
- SHEVYREV, D.; TERESHCHENKO, V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. January, p. 1–13, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03100>
- SHI, J. *et al.* Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 42, p. 17372–17377, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1114465108/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201114465SI.PDF>. Acesso em: 28 fev. 2022.
- SMOLEN, J. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. **Ann Rheum Dis**, [s. l.], v. 79, p. 685–699, 2020.
- SMOLEN, J. S. *et al.* A randomised phase II study evaluating the efficacy and safety of subcutaneously administered ustekinumab and guselkumab in patients with active rheumatoid arthritis despite treatment with methotrexate. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 831–839, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2016-209831>. Acesso em: 13 jul. 2023.
- SMOLEN, J. S. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. S685–S699, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216655>
- SMOLEN, J. S. *et al.* Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>
- SMOLEN, J. S. *et al.* Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 3–15, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2015-207524>. Acesso em: 7 mar. 2022.
- SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 2016. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
- STAHL, E. A. *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. **Nature genetics**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 508–514, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1038/NG.582>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- STERNER, R. C.; STERNER, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. **Blood cancer journal**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41408-021-00459-7>. Acesso em: 25 mar. 2022.
- SUN, J. *et al.* TGF- $\alpha$  Overexpression in Breast Cancer Bone Metastasis and Primary Lesions and TGF- $\alpha$  Enhancement of Expression of Pro-cancer Metastasis Cytokines in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **BioMed research international**, [s. l.], v. 2018, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/6565393>. Acesso em: 7 set. 2023.
- TALBOT, J. *et al.* Smoking-induced aggravation of experimental arthritis is dependent of aryl hydrocarbon receptor activation in Th17 cells. **Arthritis research & therapy**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13075-018-1609-9>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- TAVAKOLPOUR, S. *et al.* A comprehensive review of rituximab therapy in rheumatoid arthritis patients. **Clinical rheumatology**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 2977–2994, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10067-019-04699-8>. Acesso em: 7 mar. 2022.
- TAYLOR, P. C. *et al.* Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis. **The New**



**England journal of medicine**, [s. l.], v. 376, n. 7, p. 652–662, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1608345>. Acesso em: 7 mar. 2022.

THIELE, G. M. *et al.* Malondialdehyde-acetaldehyde adducts and anti-malondialdehyde-acetaldehyde antibodies in rheumatoid arthritis. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 645–655, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.38969>. Acesso em: 28 fev. 2022.

TU, J. *et al.* Synovial Macrophages in Rheumatoid Arthritis: The Past, Present, and Future. **Mediators of inflammation**, [s. l.], v. 2020, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1155/2020/1583647>. Acesso em: 2 mar. 2022.

UDALOVA, I. *et al.* Anti-TNF Therapy. **Microbiology spectrum**, [s. l.], v. 4, n. 4, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.MCHD-0022-2015>. Acesso em: 7 mar. 2022.

UDALOVA, I. A.; MANTOVANI, A.; FELDMANN, M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. **Nature reviews. Rheumatology**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 472–485, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2016.91>. Acesso em: 2 mar. 2022.

VAN DE SANDE, M. G.; BAETEN, D. L. Immunopathology of synovitis: From histology to molecular pathways. **Rheumatology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 599–606, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev330>

VAN DER HEIJDE, D. *et al.* Tofacitinib in Combination With Methotrexate in Patients With Rheumatoid Arthritis: Clinical Efficacy, Radiographic, and Safety Outcomes From a Twenty-Four-Month, Phase III Study. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 878–891, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.40803>. Acesso em: 7 mar. 2022.

VAN HAMBURG, J. P.; TAS, S. W. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. **Journal of autoimmunity**, [s. l.], v. 87, p. 69–81, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2017.12.006>. Acesso em: 2 mar. 2022.

VARANI, K. *et al.* A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. R197, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1186/ar3527>

VIATTE, S.; BARTON, A. Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response. **Seminars in immunopathology**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 395–408, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00281-017-0630-4>. Acesso em: 22 fev. 2022.

VINCENZI, F. *et al.* A(2A) adenosine receptors are differentially modulated by pharmacological treatments in rheumatoid arthritis patients and their stimulation ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0054195>. Acesso em: 4 abr. 2022.

VLAMING, M. L. H. *et al.* Abcc2 (Mrp2), Abcc3 (Mrp3), and Abcg2 (Bcrp1) are the main determinants for rapid elimination of methotrexate and its toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. **Molecular cancer therapeutics**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 3350–3359, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0668>. Acesso em: 28 mar. 2022.

VON SPEE-MAYER, C. *et al.* Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 75, n. 7, p. 1407–1415, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2015-207776>. Acesso em: 24 mar. 2022.

VYAS, S. P.; HANSDA, A. K.; GOSWAMI, R. Rheumatoid arthritis: “melting pot” of T helper subsets. **International reviews of immunology**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 212–231, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1621865>. Acesso em: 2 mar. 2022.

WAALER, E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of

sheep blood corpuscles. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, [s. l.], v. 115, n. 5, p. 422–438, 1939. Available at: [https://doi.org/10.1111/J.1600-0463.2007.APM\\_682A.X](https://doi.org/10.1111/J.1600-0463.2007.APM_682A.X). Acesso em: 28 fev. 2022.

WANG, J. *et al.* Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. **European journal of immunology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 129–138, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1002/EJI.200636435>. Acesso em: 8 mar. 2022.

WEHR, P. *et al.* Dendritic cells, T cells and their interaction in rheumatoid arthritis. **Clinical and experimental immunology**, [s. l.], v. 196, n. 1, p. 12–27, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1111/CEI.13256>. Acesso em: 2 mar. 2022.

WEINBLATT, M. E. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, [s. l.], v. 124, p. 16–25, 2013.

WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. The immunology of rheumatoid arthritis. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 10–18, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00816-x>

WHITTLE, S. L.; HUGHES, R. A. Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. **Rheumatology (Oxford, England)**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 267–271, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEH088>. Acesso em: 4 abr. 2022.

WINTHROP, K. L. The emerging safety profile of JAK inhibitors in rheumatic disease. **Nature reviews. Rheumatology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 234–243, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2017.23>. Acesso em: 7 mar. 2022.

WU, J. *et al.* TNF antagonist sensitizes synovial fibroblasts to ferroptotic cell death in collagen-induced arthritis mouse models. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–16, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27948-4>

WU, R. *et al.* Low-dose Interleukin-2: Biology and therapeutic prospects in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 10, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102645>

YANG, L.; PANG, Y.; MOSES, H. L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends in immunology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 220–227, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IT.2010.04.002>. Acesso em: 9 mar. 2022.

YANG, Y. H. *et al.* Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 976–984, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1002/ART.20201>. Acesso em: 23 nov. 2022.

YTTERBERG, S. R. *et al.* Cardiovascular and Cancer Risk with Tofacitinib in Rheumatoid Arthritis. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 386, n. 4, p. 316–326, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2109927>. Acesso em: 19 set. 2023.

ZDANOWSKA, N. *et al.* Adalimumab and methotrexate affect the concentrations of regulatory cytokines (interleukin-10, transforming growth factor-β1, and interleukin-35) in patients with plaque psoriasis. **Dermatologic therapy**, [s. l.], v. 33, n. 6, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1111/DTH.14153>. Acesso em: 16 maio 2023.

ZHAO, S. *et al.* Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2 induced osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, [s. l.], v. 131, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110628>. Acesso em: 15 maio 2023.

ZHENG, S. G. *et al.* IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 178, n. 4, p. 2018–2027, 2007. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.4.2018>. Acesso em: 9 mar. 2022.

## **8. APÊNDICES**

### **8.1 APÊNDICE I – TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre, fone: 36366-1000, Fax: 3633-1144

CEP: 14048-900, Ribeirão Preto, São Paulo

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PROJETO DE PESQUISA: “Predição de resposta terapêutica ao metotrexato em pacientes com artrite reumatoide através da análise da expressão do CD39 como biomarcador”

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa porque hoje você recebeu o diagnóstico de uma doença chamada ARTRITE REUMATOIDE. Ela é causada por uma alteração em seu próprio organismo (no sistema imunológico), que passou a causar inflamação em suas articulações, gerando dor, inchaço e calor local. Se não for tratada adequadamente e precocemente, pode deixar sequelas. A medicação de primeira escolha para o tratamento da artrite reumatoide é o metotrexato. Apesar de ser uma boa medicação, infelizmente em até metade dos pacientes ela não é suficiente para controlar completamente a doença, sendo necessários outros tratamentos. Além disso, para termos certeza que o metotrexato falhou em resolver a inflamação, é preciso esperar no mínimo três meses em uso contínuo da medicação, já que seu funcionamento é lento.

Nosso grupo de pesquisa descobriu uma forma de identificar precocemente os pacientes que irão ou não responder ao tratamento com metotrexato antes mesmo de iniciar a medicação. Assim, possivelmente, no futuro, não será mais necessário esperar três meses com inflamação nas articulações para saber que esta medicação não funciona. Essa pesquisa tem o objetivo de desenvolver esse exame laboratorial que determina precocemente quem irá responder ou não ao metotrexato. Para isso, precisamos de mais pacientes para aprimorar o método e torná-lo disponível no mundo todo.

Caso aceite participar do estudo, farei algumas perguntas presentes em um questionário que dura em média 5 minutos e, além disso, serão coletados 30 ml do seu sangue (o equivalente a uma duas colheres de sopa cheia). O questionário e a coleta de sangue são feitos imediatamente após o fim de sua consulta de rotina (ou seja, não haverá custo adicional para deslocamento), e serão realizados na sala de procedimentos que fica a 15 metros do local de consulta. Quanto ao questionário, farei perguntas sobre seus hábitos de vida (ex: se fuma, consume bebida alcoólica, realiza atividade física), e também perguntas sobre as limitações que a doença tem causado em sua vida (ex: dificuldade para caminhar, realizar atividades de casa, abrir uma torneira). Este questionário serve para avaliar o impacto da doença em sua qualidade de vida e as limitações que tem causado. Além disso, auxiliará a avaliar o quanto o tratamento com metotrexato melhorou a sua saúde. A coleta de sangue será por médico qualificado, através da punção de uma veia no antebraço com uma agulha descartável de fino calibre (23 Gauge). Possíveis complicações da coleta de sangue são dor no local da punção, tontura, mal-estar, queda temporária da pressão arterial e pequeno sangramento local. Você será prontamente atendido caso alguma complicação aconteça e nos responsabilizamos do ponto de vista médico e legal por danos causados pela pesquisa, com a devida indenização em caso de dano permanente. O sangue será utilizado para extrair células chamadas linfócitos. Na superfície dos linfócitos, avaliaremos proteínas chamadas CD39 que, quando em menor quantidade, são responsáveis pela falha ao tratamento com o metotrexato.

Após cerca de 3 meses de tratamento com o metotrexato, logo após a sua terceira consulta de rotina, exatamente o mesmo procedimento será realizado (aplicação do questionário de 5 minutos de duração seguido da coleta de 30ml de sangue).

Gostaria de enfatizar que você está sendo CONVIDADO, e que sua participação da pesquisa é completamente VOLUNTÁRIA. Você poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento e não terá nenhum prejuízo por isso. Será mantido seu seguimento médico contínuo e gratuito, com a mesma qualidade, independente da sua participação do estudo ou não. Os dados coletados serão mantidos sob sigilo e serão utilizados apenas para fins de pesquisa. O seu sangue coletado será analisado nas primeiras 24h, e não será armazenado. O resultado do exame será apresentado a você na consulta subsequente. Não haverá ressarcimento

pela participação na pesquisa. Caso aceite participar, receberá uma via deste documento assinado pelo pesquisador.

O estudo será feito no ambulatório de Artrite Reumatoide Inicial (REUC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, toda quarta-feira (exceto em feriados), das 7:30h às 12:00h. Em caso de qualquer dúvida ao longo da pesquisa, você poderá perguntar diretamente o pesquisador ou entrar em contato com o Prof. Dr. Paulo Louzada Junior (professor da disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e coordenador do estudo), neste mesmo endereço ou pelo telefone (16) 3602-2717.

Caso você tenha compreendido claramente o estudo, como será a sua participação, bem como os riscos e benefícios, assine nas duas linhas abaixo:

Assinatura do paciente ou responsável legal:

---

Nome do paciente ou responsável legal:

---

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura da testemunha:

---

Nome da testemunha:

---

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo:

---

Nome do responsável pelo estudo:

---

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Se houver alguma dúvida quanto à parte ética do projeto, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Campus Universitário s/n Monte Alegre – Ribeirão Preto, SP, telefone: (16) 3602-2228 ou pelo e-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br.

## 9. ANEXOS

### 9.1 ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PREDIÇÃO DE RESPOSTA TERAPÊUTICA AO METOTREXATE EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE ATRAVÉS DA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD39 COMO BIOMARCADOR

**Pesquisador:** Paulo Louzada Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 89092417.3.0000.5440

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.724.944

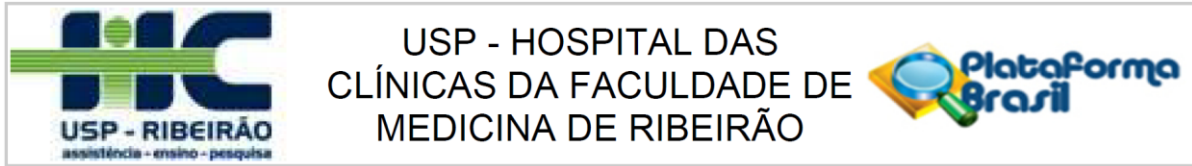
##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa da UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP, DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, DIVISÃO DE IMUNOLOGIA CLÍNICA DISCIPLINA DE REUMATOLOGIA - PROJETO DE PESQUISA - Nível: Doutorado.

##### Resumo:

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória que afeta 1% da população mundial e é caracterizada por um inalterado de células do sistema imune no espaço sinovial articular. A primeira escolha para o tratamento da AR consiste no uso de doses baixas de metotrexate (MTX). No entanto, uma parte considerável dos pacientes com AR é refratária ao tratamento com MTX (40-50%) e o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre ainda não foi estabelecido. O efeito antiinflamatório do MTX associa-se com sua capacidade de aumentar os níveis extracelulares de adenosina (ADO). Neste contexto, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que pacientes com AR não responsivos ao tratamento com MTX (UR-MTX) apresentam uma menor expressão da ectonucleotidase CD39 em células T reguladoras (Tregs) circulantes. Esta ectonucleotidase é uma das principais vias de produção de adenosina extracelular, através da metabolização do ATP e ADP. Logo, a análise de alterações nas vias de regulação da expressão de CD39 em células Tregs é um passo importante para esclarecer os fenômenos relacionados à

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.724.944

refratariedade ao MTX em

pacientes com AR. Em 2013, o nosso grupo depositou no INPI uma patente para o desenvolvimento de kit para a identificação de respondedores ao MTX em pacientes com AR por meio da análise da densidade da expressão de CD39 em Tregs pré-tratamento (Registro: BR1020130109967). Desta feita, o objetivo geral deste projeto é estabelecer melhorias ao método, aumentando o número de paciente e determinando um valor de corte, no intuito de possibilitar o seu emprego em laboratórios clínicos de rotina. Para esse fim, propomos um estudo cego, randomizado, prospectivo com 120 pacientes recém diagnosticados com AR inicial virgens de tratamento, que receberão MTX como primeira terapia, sendo reavaliados após 3-4 meses, e classificados como respondedores ou não-respondedores. Nestes dois tempos serão realizadas determinações para avaliar o mecanismo de indução e regulação da expressão de CD39 em células Tregs, pois a expressão de CD39 na superfície de células Tregs circulantes poderia representar um futuro biomarcador de responsividade ao MTX para o tratamento da AR.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo primário avaliar a acurácia da expressão do CD39 em células CD4+CD25+FoxP3+ (Tregs) como biomarcador preditor de resposta ao tratamento com MTX em pacientes com AR, visando o desenvolvimento de um kit para aplicação na prática clínica diária. Colaterais desnecessários associados ao uso do MTX, talvez o uso da leflunomida com primeira opção em pacientes com baixa expressão de CD39 em Tregs diminua as indicações de terapia biológica na AR. Com a exceção do tocilizumabe (anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor de IL-6), todos as DMCDs biológicas conceitualmente necessitam ser utilizados em associação com uma DMCD sintética no tratamento da AR, sendo o MTX a droga mais utilizada. O uso do CD39 como preditor de resposta ao MTX poderá evitar a prescrição contínua da droga em pacientes em uso de biológicos que não estarão apresentando qualquer benefício desta associação, evitando, assim, custos e efeitos colaterais desnecessários. Até o presente momento, não existe nenhum biomarcador utilizado na prática clínica como preditor de resposta à terapia da AR, seja DMCD sintética ou biológica. Apesar dos importantes avanços no diagnóstico precoce, opções terapêuticas e estabelecimento de metas para controle da doença (estratégia “treat to target” e o conceito de janela de oportunidade), o tratamento da artrite reumatoide ainda longe do ideal. Apesar da terapia antiTNF e outras DMCDs biológicas terem aberto uma importante porta para tratamento da doença, quando se analisa friamente os dados dos estudos clínicos, o ACR 70 é alcançado apenas 20% dos pacientes

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO

**Bairro:** MONTE ALEGRE

**CEP:** 14.048-900

**UF:** SP

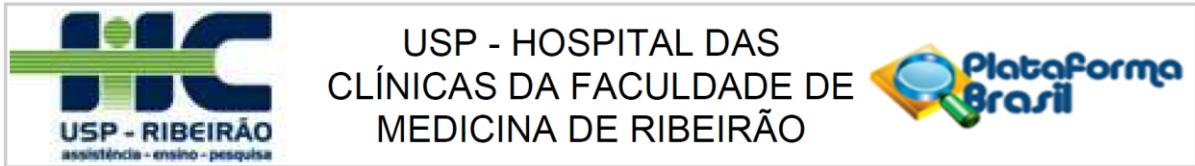
**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3602-2228

**Fax:** (16)3633-1144

**E-mail:** cep@hcrp.usp.br





Continuação do Parecer: 2.724.944

refratários ao MTX (revisado por Smolen e Aletaha, 2015). Acreditando que um importante avanço no tratamento da AR consiste na otimização no uso dos DMCDs sintéticas, propomos um estudo multicêntrico, randomizado, longitudinal, com um grande número de pacientes, para avaliar a acurácia de um kit comercial inédito (já patenteado pelo nosso grupo de pesquisa) para a detecção precoce dos pacientes não respondedores ao MTX. Até o presente momento não existe no mercado nenhum exame com finalidade similar, seja para prever resposta ao MTX ou a qualquer outra droga no tratamento da AR. Em suma, este biomarcador poderá não só melhorar o prognóstico funcional dos pacientes como AR, como possivelmente irá reduzir os custos do tratamento da doença caso o teste torne-se amplamente disponível.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os pacientes receberão o mesmo tratamento, independente de participarem ou não da pesquisa. Assim, o único risco consistem na coleta de 15 ml de sangue periférico, que pode causar dor local e pequeno sangramento.

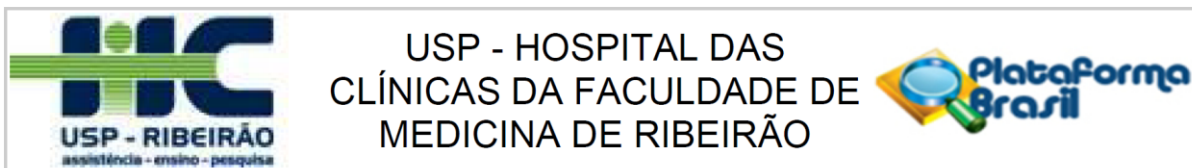
Benefícios:

Consideramos que a mensuração da expressão de CD39 em Tregs possa tornar-se um teste simples, rápido e de baixo custo (o preço de produção por exame custa em média USD 15,00) para ser utilizado na prática clínica como biomarcador preditor de resposta ao tratamento da AR com MTX. Para tanto, é necessário um estudo robusto, com grande número de pacientes e com rígida qualidade metodológica para determinar o melhor valor de corte em termos de sensibilidade e especificidade do exame. Entendemos que, através da detecção precoce dos pacientes que não responderão ao MTX, evitaremos o uso desnecessário dessa medicação em

30-50% dos pacientes com AR inicial, optando por medicação alternativa (com especial destaque para a leflunomida). Assim, além de evitar atraso na obtenção da remissão da doença e efeitos colaterais desnecessários associados ao uso do MTX, talvez o uso da leflunomida com primeira opção em pacientes com baixa expressão de CD39 em Tregs diminua as indicações de terapia biológica na AR. Com a exceção do tocilizumabe (anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor de IL-6), todos as DMCDs biológicas conceitualmente necessitam ser utilizados em associação com uma DMCD sintética no tratamento da AR, sendo o MTX a droga mais utilizada. O uso do CD39 como preditor de resposta ao MTX poderá evitar a prescrição contínua da droga em pacientes em uso de biológicos que não estarão apresentando qualquer benefício desta associação, evitando, assim, custos e efeitos colaterais desnecessários. Até o presente momento, não existe nenhum biomarcador utilizado na prática clínica como preditor de resposta à terapia da

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br





Continuação do Parecer: 2.724.944

AR, seja DMCD sintética ou biológica. Apesar dos importantes avanços no diagnóstico precoce, opções terapêuticas e estabelecimento de metas para controle da doença (estratégia “treat to target” e o conceito de janela de oportunidade), o tratamento da artrite reumatoide ainda longe do ideal. Apesar da terapia antiTNF e outras DMCDs biológicas terem aberto uma importante porta para tratamento da doença, quando se analisa friamente os dados dos estudos clínicos, o ACR 70 é alcançado apenas 20% dos pacientes refratários ao MTX (revisado por Smolen e Aletaha, 2015). Acreditando que um importante avanço no tratamento da AR consiste na otimização no uso dos DMCDs sintéticas, propomos um estudo multicêntrico, randomizado, longitudinal, com um grande número de pacientes, para avaliar a acurácia de um kit comercial inédito (já patenteado pelo nosso grupo de pesquisa) para a detecção precoce dos pacientes não respondedores ao MTX. Até o presente momento não existe no mercado nenhum exame com finalidade similar, seja para prever resposta ao MTX ou a qualquer outra droga no tratamento da AR. Em suma, este biomarcador poderá não só melhorar o prognóstico funcional dos pacientes como AR, como possivelmente irá reduzir os custos do tratamento da doença caso o teste torne-se amplamente disponível.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

##### Metodologia Proposta:

O trabalho será realizado na Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os pacientes serão avaliados no Ambulatório de Artrite Reumatoide Inicial e as determinações de autoanticorpos e separação de células no laboratório de Imunologia da Divisão de Imunologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da FMRP/USP. A pesquisa com humanos será conduzida de acordo com o comitê de ética para humanos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos esses pacientes, na consulta inicial, serão caracterizados clínico e laboratorialmente e avaliados quanto à atividade da doença pelo índice de atividade DAS28 e pela aplicação do HAQ-DI (the health assessment questionnaire). Serão coletados 15 ml de sangue com EDTA. Todos os pacientes serão

esclarecidos quanto ao estudo e, caso desejem participar, deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes receberão como tratamento inicial MTX na dose de 15-20 mg/semana, associado ou não a prednisona dose inicial 10-20 mg/dia, reduzindo a dose até suspensão ou dose máxima de 5 mg/dia. Após 12- 16 semanas de tratamento, todos os pacientes serão reavaliados em relação à atividade da doença e ao HAQ, e será feita nova coleta de sangue para os mesmos ensaios celulares e séricos da

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.724.944

primeira avaliação, para os respondedores e para os não-respondedores ao MTX. O cálculo amostral (120 pacientes) foi realizado utilizando-se a calculadora on-line disponível do site <http://www.calculoamostral.vai.la>. (SANTOS, Glauber Eduardo de Oliveira. Cálculo amostral: calculadora online. Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: [data do acesso: 15/11/2016]. As características quantitativas dos indivíduos serão comparadas usando o teste t-student, quando apropriado. Variáveis categóricas e as frequências genóticas serão comparadas entre os grupos usando teste de Fisher. As análises estatísticas dos dados com múltiplos grupos serão realizadas pelos métodos de variância multivariada (MANOVA), variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), e teste de comparações múltiplas de Bonferroni (teste t), de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo as diferenças consideradas significantes para valores de  $P < 0,05$ . A

validade preditiva, sensibilidade e especificidade dos valores de expressão de CD39 em Tregs (MFI) entre respondedores e não respondedores ao MTX serão calculadas utilizando o Receptor Operacional Characteristic (curva ROC). Os cálculos estatísticos serão realizados empregando os programas InStat 3 e MedCalc Statistical Software version 16.8.4 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

**Critério de Inclusão:**

Serão considerados critérios de inclusão: indivíduos com mais de 18 anos de ambos os sexos, início dos sintomas de AR há mais de 6 semanas e menos 24 meses, e DAS28 (Disease Activity Score- 28 joints) > 3,2 na primeira avaliação.

**Critério de Exclusão:**

Serão considerados critérios de exclusão: presença de doenças infecciosas e outras doenças autoimunes, uso prévio de DMARDs e uso de corticoide na primeira avaliação em doses equivalentes a prednisona >10mg/dia.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram corrigidos de acordo com parecer emitido pelo CEP.

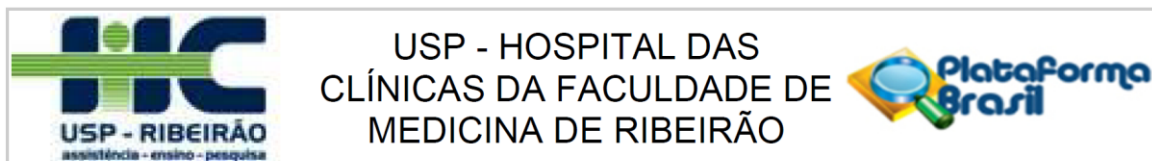
**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão numero 2. Data de modificação 09/06/2018, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão numero 2. Data de modificação 09/06/2018, podem ser enquadrados na categoria

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.724.944

APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_855592.pdf	09/06/2018 16:24:42		Aceito
Outros	Pendencias09062018.docx	09/06/2018 16:23:39	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_caio_09_06_2018.docx	09/06/2018 16:16:30	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_caio_09_06_18.docx	09/06/2018 16:15:31	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_caio07_05_2018.docx	07/05/2018 14:13:01	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
Outros	Formulario_UPC.jpg	07/05/2018 14:02:33	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	23/05/2017 19:05:46	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	23/05/2017 19:05:32	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 2.724.944

RIBEIRAO PRETO, 20 de Junho de 2018

---

**Assinado por:**  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
(Coordenador)

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO

**Bairro:** MONTE ALEGRE

**CEP:** 14.048-900

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3602-2228

**Fax:** (16)3633-1144

**E-mail:** cep@hcrp.usp.br

## 9.2 ANEXO II – CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS ACR/EULAR 2010

<b>Critérios</b>	<b>Nº de pontos</b>
<b>Número e local das articulações envolvidas</b>	
2 a 10 grandes articulações	1 ponto
1 a 3 pequenas articulações	2 pontos
4 a 10 pequenas articulações	3 pontos
Mais 10 articulações (incluindo uma pequena articulação)	5 pontos
<b>Alterações sorológicas (FR ou anti-CCP)</b>	
Positivo em baixos títulos (1-3x o limite superior)	2 pontos
Positivo em altos títulos ( $\geq 3x$ o limite superior)	3 pontos
Elevação de provas inflamatórias (VHS ou PCR)	1 ponto
Duração dos sintomas articulares $\geq 6$ semanas	1 ponto

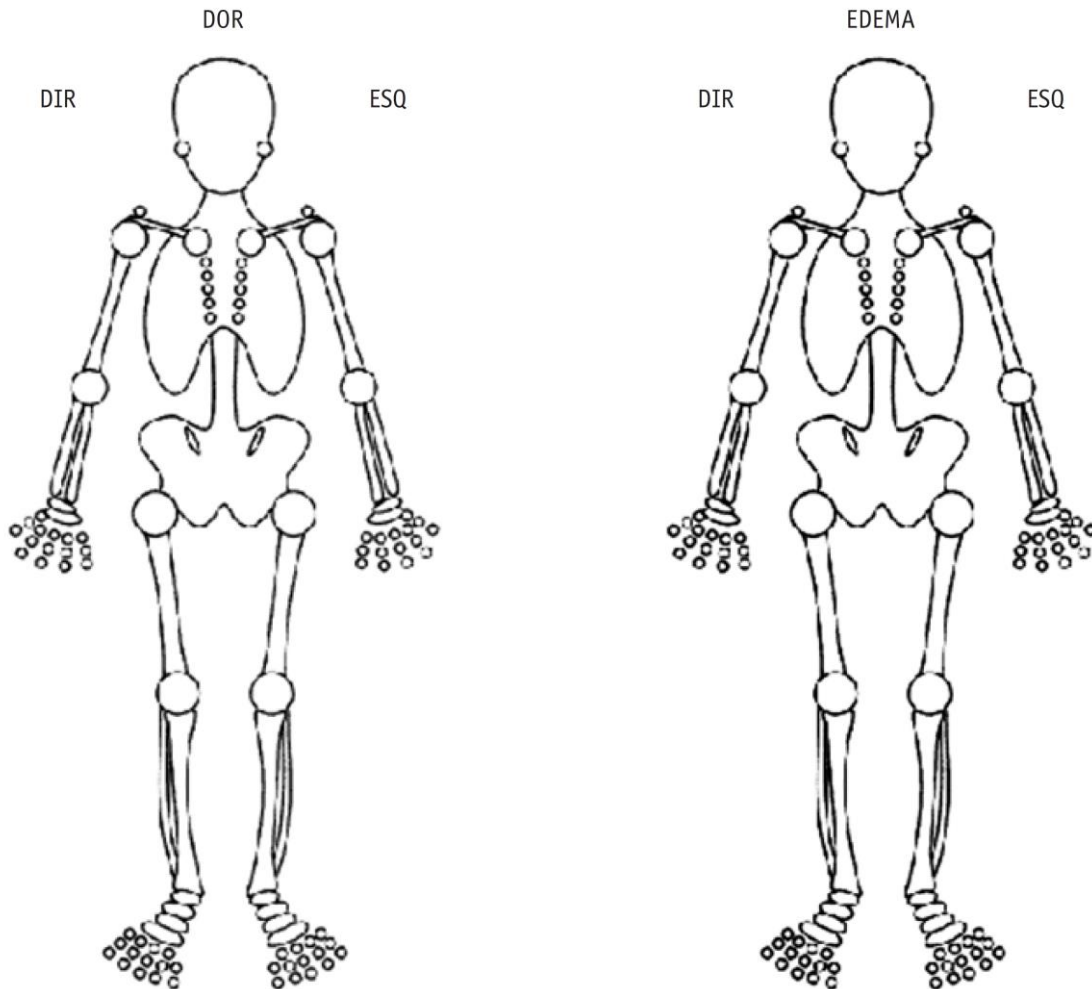
FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C reativa.

Segundos os critérios ACR/EULAR 2010, o paciente preenche os critérios classificatórios de artrite reumatoide na presença de sinovite em uma ou mais articulações, **soma total de 6 pontos** nos critérios acima e ausência de outro diagnóstico que explique melhor a presença de artrite.



### 9.3 ANEXO III – DAS28

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



NAD: \_\_\_\_ (0-28)

NAE: \_\_\_\_ (0-28)

VHS: \_\_\_\_

AG: \_\_\_\_ (0-100)

<b>DAS28 &lt;2.6: Remissão</b>
<b>DAS28 ≥2.6 e ≤3.2: Baixa atividade da doença</b>
<b>DAS28 &gt;3.2 e ≤5.1: Moderada atividade da doença</b>
<b>DAS28 &gt; 5.1: Alta atividade da doença</b>

**Fórmula do DAS28 (VHS) =**

$$(0.56 * \sqrt{(NAD)}) + (0.28 * \sqrt{(NAE)}) + (0.7 * \ln(VHS)) + (0.014 * AG)$$

NAD: número de articulações dolorosas; NAE: número de articulações edemaciadas; VHS: velocidade de hemossedimentação; AG: Avaliação Global do paciente (nota que o paciente fornece sobre o seu bem-estar variando de 0 a 100);  $\sqrt{\quad}$ : raiz quadrada;  $\ln$ : logaritmo neperiano.

### 9.3 ANEXO IV – HAQ-DI

#### Capacidade Funcional (*Health Assessment Questionnaire-Disability Index* – HAQ-DI)

Nesta seção, gostaríamos de saber como a sua doença afeta a sua capacidade de realizar suas atividades do dia-a-dia. Sinta-se à vontade para acrescentar qualquer comentário na parte de trás desta página.

Por favor, marque com um X a resposta que melhor descreve sua capacidade em realizar as atividades do dia-a-dia. NA SEMANA QUE PASSOU:

	Sem NENHUMA dificuldade	Com ALGUMA dificuldade	Com MUITA dificuldade	Incapaz de fazer
<b>Vestir-se e arrumar-se</b>				
Você foi capaz de:				
• <u>Vestir-se, inclusive amarrar o cadarço do sapato e abotoar a roupa?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Lavar seu cabelo?</u>	_____	_____	_____	_____
<b>Levantar-se</b>				
Você foi capaz de:				
• <u>Levantar-se de uma cadeira sem se apoiar?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Deitar-se e levantar-se da cama?</u>	_____	_____	_____	_____
<b>Comer</b>				
Você foi capaz de:				
• <u>Cortar um pedaço de carne?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Levar uma xícara ou copo cheio até sua boca?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Abrir uma caixa de leite nova?</u>	_____	_____	_____	_____
<b>Andar</b>				
Você foi capaz de:				
• <u>Andar fora de casa em lugar plano?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Subir cinco degraus?</u>	_____	_____	_____	_____

Por favor, marque com um X os tipos de APOIOS OU APARELHOS que você geralmente usa para qualquer uma das atividades acima:

_____ Bengala	_____ Aparelhos usados para se vestir (abotoador, gancho para puxar o zíper, calçadeira comprida, etc.)
_____ Andador	_____ Utensílios de cozinha especiais ou feitos sob medida
_____ Muletas	_____ Cadeiras especiais ou feitas sob medida
_____ Cadeira de rodas	_____ Outros (descreva: _____)

Por favor, marque com um X as atividades para as quais você geralmente precisa de AJUDA DE OUTRA PESSOA:

_____ Vestir-se e arrumar-se	_____ Comer
_____ Levantar-se	_____ Andar

Por favor, marque com um X a resposta que melhor descreve sua capacidade em realizar as atividades do dia-a-dia. NA SEMANA QUE PASSOU:

	Sem NENHUMA dificuldade	Com ALGUMA dificuldade	Com MUITA dificuldade	Incapaz de fazer
<b>Higiene</b>				
Você foi capaz de:				
• <u>Lavar e secar seu corpo?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Tomar um banho de banheira / chuveiro?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Sentar e levantar-se de um vaso sanitário?</u>	_____	_____	_____	_____
<b>Alcançar objetos</b>				
Você foi capaz de:				
• <u>Alcançar e pegar um objeto de cerca de 2 quilos (por exemplo, um saco de batatas) colocado acima da sua cabeça?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Curvar-se ou agachar-se para pegar roupas no chão?</u>	_____	_____	_____	_____
<b>Pegar</b>				
Você foi capaz de:				
• <u>Abrir as portas de um carro?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Abrir potes que já tenham sido abertos?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Abrir e fechar torneiras?</u>	_____	_____	_____	_____
<b>Atividades</b>				
Você foi capaz de:				
• <u>Ir ao banco e fazer compras?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Entrar e sair de um carro?</u>	_____	_____	_____	_____
• <u>Fazer tarefas de casa (por exemplo, varrer e trabalhar no jardim?)</u>	_____	_____	_____	_____

Por favor, marque com um X os tipos de APOIOS OU APARELHOS que você geralmente usa para qualquer uma das atividades acima:

____ Vaso sanitário mais alto	____ Barra de apoio na banheira / no chuveiro
____ Banco para tomar banho	____ Aparelho com cabo longo para alcançar objetos
____ Abridor de potes (para potes que já tenham sido abertos)	____ Objetos com cabo longo para o banheiro (por exemplo, uma escova para o corpo)
	____ Outros (descreva: _____)

A nota em cada questão varia de 0 (sem nenhuma dificuldade) a 3 (incapaz de fazer). O índice HAQ final consiste na média dos escores em cada uma das 8 categorias:

<b>HAQ-DI &lt; 0.3:</b> Normal
<b>HAQ-DI ≥ 0.3 e &lt; 1:</b> Incapacidade leve
<b>HAQ-DI ≥ 1 e &lt; 2:</b> Incapacidade moderada
<b>HAQ-DI ≥ 2:</b> Incapacidade grave