

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E FARMÁCIA



**Influência da farmacogenómica na
terapêutica da artrite reumatóide**

Inês Carolina Ribeiro de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Professora Doutora Vera Ribeiro

2017

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E FARMÁCIA



**Influência da farmacogenómica na
terapêutica da artrite reumatóide**

Inês Carolina Ribeiro de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

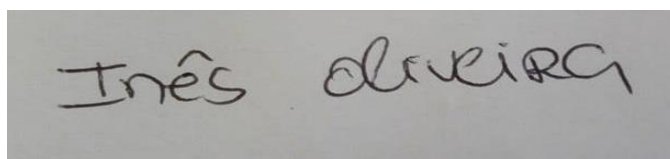
Orientadora: Professora Doutora Vera Ribeiro

2017

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright©



Inês Oliveira

A universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória e agradecimentos

A realização desta tese de mestrado marca uma etapa importante e crucial de desenvolvimento pessoal e educacional, marca também o alcançar de mais uma meta na minha vida.

Queria deixar o meu agradecimento à minha orientadora, professora Vera Ribeiro, pela sua preciosa ajuda e compreensão durante a realização desta monografia. Para além, de orientadora, é uma ótima docente nas unidades curriculares do curso que é responsável, foi graças à sua metodologia de ensino que adquiri o gosto pela farmacogenómica.

Agradeço também à minha família, em especial à minha mãe e ao meu pai, pelo esforço que fizeram nestes cinco anos de curso, sei que não foi fácil, mas por mais dificuldades que tenham passado, senti sempre o vosso apoio nos piores momentos.

Para a minha tia Margarida, um grande obrigado! Foi para entender melhor esse teu flagelo que escrevi esta monografia, agora tenho a confirmação que tu és uma guerreira e que embora debilitante, essa doença não te tira a vontade e o gosto que tens pela vida.

Um especial obrigado para a Hannah Franco, Andy Coninckx e Isabel Luz, por serem a minha família e o meu porto seguro no Algarve.

A todos os meus amigos, e em particular à Claudia Duarte, Vanessa Vergas, Carina Martins, Rafael Francisco, Sílvia Filipe e Davide Marques, obrigada pela paciência e pelo apoio ao longo destes anos.

Para todos as pessoas que sofrem com artrite reumatóide, continuem a luta e não se deixem abalar pelas dificuldades, tenham esperança na ciência e na medicina.

A todos eles dedico este trabalho.

Resumo

A artrite reumatoide é uma doença músculo-esquelética autoimune, crónica e de carácter inflamatório que irrompe nas articulações, mas que pode culminar no envolvimento sistémico, perturbando o sistema cardiovascular, hematológico e pulmonar. Tem uma incidência global de 0,5-1%, manifestando-se mais no sexo feminino do que no sexo masculino. Esta doença é responsável por uma grande despesa na saúde pública, levando também a problemas sociais e económicos aos doentes, pois em diversos casos, impede a atividade laboral.

Na atualidade existem várias opções terapêuticas com provas científicas de eficácia na redução da atividade da doença e da remissão da mesma. O fármaco utilizado como primeira linha é o metotrexato, sendo utilizado nesta patologia em doses baixas e com administração por via oral ou por via subcutânea. Pertence à classe dos fármacos modificadores de doença reumática, tendo uma origem sintética e é amplamente utilizado em monoterapia ou em terapêutica combinada com outros modificadores da doença, quer de origem sintética quer de origem biológica.

Após estudos na área da farmacogenómica, começou-se a perceber que alguns polimorfismos nos genes das enzimas inerentes ao mecanismo de ação do metotrexato, levam à criação de genótipos que estão associados a diferenças na resposta ao fármaco. Estes polimorfismos traduzem-se, nalguns casos, no aumento da resposta terapêutica e noutros numa eficácia reduzida, levando ao avanço da doença. Devido a esta variabilidade entre os doentes é urgente uma maior incidência de estudos para que se preste um tratamento personalizado a cada doente.

Com este trabalho pretendeu-se efetuar uma revisão bibliográfica da evidência existente sobre a influência da variabilidade genética nas várias enzimas responsáveis pelo mecanismo terapêutico do metotrexato e pela sua farmacocinética, avaliando a associação da resposta terapêutica com os diversos genótipos encontrados no genoma dos doentes de artrite reumatoide.

Palavras-chave: artrite reumatoide, doença autoimune, metotrexato, polimorfismos, resposta terapêutica

Abstract

Rheumatoid arthritis is an autoimmune, chronic, inflammatory, muscular-skeletal disease that erupts in the joints but can lead to a systemic involvement. Rheumatoid arthritis affects 0,5-1% of the adult population worldwide and occurs more frequently in women than in men. This disease is responsible for a large expense in public health, and for social and economic problems for the patients because it prevents normal work activity.

Nowadays, there are many therapeutic options with the ability to slow down or prevent structural progression of rheumatoid arthritis leading to disease remission. Low doses of methotrexate are the most frequently used disease-modifying anti-rheumatic drug and is the anchor drug for most combination therapies with other conventional and biological disease-modifying anti-rheumatic drugs.

Several studies in pharmacogenetics have shown that some genetic polymorphisms in enzymes involved in the effect of methotrexate result in a significant variability in clinical response among patients under treatment with methotrexate. These polymorphisms can be responsible for a change in therapeutic response, clinical efficacy and disease progression. There is therefore an urgent need to make a greater effort to continue the research in this area with the goal of improving the therapeutic response and quality of life for all patients with rheumatoid arthritis.

The aim of this work was to review the influence of genetic variability on the various enzymes involved in methotrexate action pathways and in its pharmacokinetics, evaluating the association of the therapeutic response with the different genotypes found in the genome of patients with rheumatoid arthritis.

Keywords: Rheumatoid arthritis, autoimmune disease, methotrexate, polymorphism, therapeutic response.

Índice de tabelas

Tabela 2.1-Critérios de classificação da artrite reumatóide ACR-EULAR.....	17
Tabela 3.1- Melhorias dos parâmetros da atividade da doença ao longo do estudo (efetividade na população).....	46
Tabela 3.2- Tabela esquemática da metodologia de administrações dos fármacos no estudo de Maini	58
Tabela 3.3-Percentagem de melhorias na resposta segundo critérios ACR em função do tempo ao longo do estudo.....	61
Tabela 3.4-Percentagem de melhorias na resposta segundo critérios ACR após a trocar de metodologia em função de dois anos de estudo	62
Tabela 3.5-Taxas de resposta à terapêutica em função dos critérios de melhoria ACR ao do estudo.....	63
Tabela 4.1-Relação entre os alelos para o haplótipo 1 do o gene ABCC1 e a resposta clínica ao MTX.....	69
Tabela 4.2-Relação entre os alelos para o haplótipo 2 do o gene ABCC1 e a resposta clínica ao MTX.....	69
Tabela 4.3-Número de pacientes (em percentagem) com ausência/presença de resposta ao MTX em função do seu genótipo	70
Tabela 4.4-Avaliação da atividade da doença pelo índice DAS28 em função do genótipo dos doentes para o SNP ABCB1 2677G>A/T.....	71
Tabela 4.5-Análise dos genótipos dos pacientes em estudo e correlação com a resposta ao MTX	74
Tabela 4.6-Descrição da população em estudo baseada no seu genótipo para o SNP C677T.....	77
Tabela 4.7-Correlação entre resposta ao MTX com variabilidade para o SNP C677T..	77
Tabela 4.8-Correlação dos genótipos para o SNP C677T com o número de pacientes em estudo.....	79
Tabela 4.9-Correlação dos genótipos para o SNP A1298C com o número pacientes em estudo.....	80
Tabela 4.10-Relação do número de doentes com e sem recaídas em função do seu genótipo para os SNP's MTHFR 677C>T e 1298A>C	81
Tabela 4.11-Relação do genótipo para o polimorfismo VNTR e haplótipo TSER com a resposta clínica ao fármaco.....	84

Índice de quadros

Quadro 3.1-Classificação de AINEs.....	38
Quadro 3.2-Efeitos adversos associados à toma de AINEs.....	40

Índice de gráficos

Gráfico 2.1-Odds ratio para a conjugação alelos HLA-EP, hábitos tabágicos e ACPA positivos.....	28
Gráfico 2.2-Odds ratio para a conjugação alelos HLA-EP, hábitos tabágicos e ACPA positivos.....	28
Gráfico 3.1-Evolução da atividade da doença (pelo DAS28 score) durante as semanas de tratamento dos pacientes com LEF.....	47
Gráfico 3.2-Percentagem de pacientes de cada grupo que após 54 semanas de estudo entraram em remissão.....	51

Índice de figuras

Figura 1.1--Esquema representando uma vista superior das suturas do crânio.....	1
Figura 1.2-Elementos constituintes de uma articulação sinovial.	2
Figura 2.1-Pintura de Peter Paul Rubens intitulada de “The Three Graces”. Pintura exposta no Museu Nacional do Prado, Madrid.	5
Figura 2.2-Incidência global da AR	7
Figura 2.3-Deformações nas articulações metacarpofalângicas.....	9
Figura 2.4-Presença de nódulos reumatóides no cotovelo de doente de artrite reumatóide.	10
Figura 2.5-Imagiologia por Raio-X do derrame pleural no pulmão direito.	11
Figura 2.6-Incidência de anticorpos no plasma sanguíneo ao longo do tempo. Análise feita antes da sintomatologia	14
Figura 2.7-Esquema da reação enzimática de citrulinização.....	15
Figura 2.8-Disrupção das ligações intramoleculares e consequente desnaturação proteica.	15

Figura 2.9-Probabilidade ao longo do tempo dos pares de gémeos desenvolverem artrite reumatóide.	20
Figura 2.10-Epítomos codificados pela terceira região hipervariável associados à doença..	21
Figura 2.11- A-Taxa de ativação da luciferase dependente da expressão das isoformas da Lyp, em células humanas da linhagem T. B- Taxa de ativação da luciferase dependente da expressão das isoformas da Lyp, em células da linhagem Jurkat.....	24
Figura 2.12-Esquema da localização do gene TNF no MHC e dos SNP's com importância para a patologia.....	25
Figura 2.13-Evolução natural da doença, composta por 3 fases: A fase pré-articular, fase de transição (inflamação subclínica) e a fase articular.....	30
Figura 2.14-Esquema do possível mecanismo de patogénese na AR, instigado pelos Th17.....	32
Figura 2.15-Mecanismo mais provável do papel dos macrófagos na modulação das células CD4+	33
Figura 2.16-Amostras de tecido sinovial de humano. A- Tecido e membrana sinovial saudáveis. B- Tecido de um doente de AR, com uma hipertrofia da membrana sinovial.....	34
Figura 2.17-Esquema do mecanismo de regulação da matriz cartilaginosa pelos condrócitos e desregulação deste mecanismo por citocinas que resulta na degradação da matriz.....	35
Figura 2.18-Esquema da regulação da diferenciação de osteoclastos na AR.....	36
Figura 3.1-A-Comparação do efeito anti-inflamatório da terapêutica prolongada com AINEs não seletivos e inibidores da COX-2 na dor articular; B-Comparação do efeito anti-inflamatório da terapêutica prolongada com AINEs e inibidores da COX-2 no número de articulações com edema.....	39
Figura 3.2-Esquema dos mecanismos anti-inflamatório e imunossupressor dos glucocorticoides, através da modelação de genes	41
Figura 3.3-Esquema dos vários mecanismos de ação do metotrexato	44
Figura 3.4- Melhorias segundo ACR20/50/70 após 24 e 48 semanas de tratamento.....	60
Figura 3.5-Esquema do logaritmo terapêutico	64
Figura 4.1-Probabilidade de EFS nos pacientes em função do seu genótipo.....	67
Figura 4.2- Sobrevivência livre de evento (EFS) para doentes com LLA segundo o seu genótipo para os SNP's -317A>C e -1610C>G/T.....	75

Figura 4.3-Sobrevivência livre de evento (EFS) para doentes com LLA segundo o seu genótipo para os SNP's -317A>C e -1610C>G/T..... 76

Figura 4.4-Comparação do Δ DAS28 após 6 meses de tratamento com os genótipos para os dois SNP's..... 78

Figura 4.5-Comparação do índice DAS28 dos doentes de artrite com os seus genótipos para o SNP A1298C 80

Figura 4.6- A-Análise por Kaplan–Meier das curvas de sobrevida livre de doença (DFS) durante 7 anos em função dos genótipos C677T. B- Análise por Kaplan–Meier das curvas de sobrevida global (OS) em função dos genótipos C677T. 82

Figura 4.7-Análise por Kaplan-Meier das curvas de probabilidade de sobrevivência entre os doentes dependendo do seu genótipo para o MTHFR C677>T..... 82

Figura 4.8-Figura esquemática do gene TYMS, onde é possível visualizar as diversas repetições das 28 bp (VNTR) e as “ACTT-box”..... 83

Figura 4.9-Probabilidade de descontinuação do MTX por toxicidade, conforme a variabilidade genética no SNP s16853826 G>A 88

Figura 4.10-Probabilidade de descontinuação do MTX por toxicidade, conforme a variabilidade genética no SNP rs10197559 C>T 89

Lista de abreviaturas

5'-UTR- Região 5' não-traduzida

A – Adenina

AA- Aminoácido

Ac- Anticorpo

ACPA- Anticorpos Anti Proteínas Citrulinadas

ACR- Colégio Americano de Reumatologia (do inglês, American college of rheumatology)

ADA - Adenosina desaminase

ADAMT's - desintegrina-metaloproteases com um domínio idêntico à trombospondina

Ag- Antígeno

AICAR - ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida

AINEs- Anti-inflamatórios não esteroides

APC- Células apresentadoras de antígenos, do inglês *antigen presenting cell*

APRIL- Fatores de proliferação induzida por ligação (do inglês, *proliferation-inducig ligand*)

AR – Artrite Reumatóide

Arg- Arginina

bDMARDs- DMARDs biológicos

BlyS- Estimuladores de linfócitos B (do inglês *B-lymphocyte stimulator*)

bp- Pares de base

C- Citosina

CCP - Péptidos citrulinados cíclicos

CDV- Cardiovasculares

COX-1- Cicloxigenase-1

COX-2- Cicloxigenase-2

CYP- citocromo P450

DAS28 – Índice de atividade da doença, do inglês Disease Activity Score 28

DHF - Dihidrofolato

DHFR - Dihidrofolato Redutase

DHL - Desidrogenase Láctica

DHODH - Enzima Dehidrorotato Dehidrogenase

DMARDs - Modificadores da doença reumática, do inglês *disease modifying antirheumatic drugs*

DSF - Sobrevida livre da doença, do inglês *disease-free survival*

Dtmp - desoxitimidilato

Dump - desoxiuridilato

EFS - Sobrevida livre de evento, do inglês *event-free survival*

EP- epítomos partilhados

EUA - Estados Unidos da América

EULAR - Liga europeia contra o reumatismo (EULAR do inglês, *European League Against Rheumatism*)

Fab - Fragmento antigénico, do inglês *fragment antigen-binding*

FAICAR – formil ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida

FDA- *Food and Drug Administration*

FPGS - Folilpoliglutamato Sintase

FR - Fator Reumatóide

G - Guanina

GGH - γ -glutamil hidrolase

gp-P – glicoproteína-P

HCQ - hidroxicloroquina

HLA - Antígenos leucocitários, do inglês *human leucocyte antigen*

HTA - Hipertensão Arterial

I.V- Intravenosa

IECA - Inibidores da enzima de conversão da angiotensina

IFN - Interferão

IFP's - Interfalângicas Proximais

IL – Interleucina

IL-1R1 - recetor tipo 1 da IL-1

IL-6R - recetor da IL-6

ITAM - Imunorreceptores de tirosina, do inglês *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*

JAK - Janus cinase

LEF - Leflunomida

LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda

LOX - Lipoxigenase

MCF's - Metacarpofalângicas

MEA – Manifestações Extra-Articulares

MHC- Complexo Maior de Histocompatibilidade

MMP - Metaloproteínas

MTF's - Metatarsofalângicas

MTHFD- Metilenotetrahidrofolato Desidrogenase

MTHFR - Metilenotetrahidrofolato Redutase

MTX - Metotrexato

NK - do inglês, *natural killers*

OPC - Osteoprotegerina

OR - *Odds ratio*

OS - Sobrevida global, do inglês *overall survival*

PA - Pressão Arterial

PAD - Peptidil Arginina Desaminase

PCR - Proteína C-reativa

PGs - Prostaglandinas

PPI - Inibidores das bombas de próton

PTP – Proteína tirosinafosfatase, do inglês Tyrosine Phosphatase Protein

PTPN22- Tirosinafosfatase não-recetor 22

RANKL- Ligando recetor ativador do fator nuclear- *kappa B*

RFA- Resposta de Fase Aguda

RR – Risco Relativo

SAM - S-adenosilmetionina

SC - Subcutânea

SI- Sistema Imunitário

SNP- Polimorfismo de nucleótido único (do inglês *single Nucleotide Polymorphism*)

SSZ - Sulfasalazina

T- Timina

TB - Tromboxanos

TC - Linfócito Tcitotóxico

TCR - Recetor das células T

tDMARDs - DMARDs tradicionais

Th - Linfócito Thelper

THF - Tetrahidrofolato

TNF- α – Fator de necrose tumoral α , do inglês *tumor necrosis factor α*

TRAF1- do inglês *TNF receptor associated factor 1*

Treg - Linfócito T regulador

Trp - Triptofano

TYMS - Timidilato Sintase

VNTR - Número variado de repetições seguidas, do inglês *Variable Number Tandem Repeat*

VSG- Velocidade de Sedimentação Globular

Índice de conteúdos

Resumo	v
Abstract.....	vi
Índice de tabelas	vii
Índice de quadros.....	viii
Índice de gráficos.....	viii
Índice de figuras	viii
Lista de abreviaturas	xi
1 Introdução.....	1
2 Artrite reumatoide	4
2.1 Perspetiva histórica e definição da patologia.....	4
2.2 Dados epidemiológicos.....	6
2.3 Quadro clinico.....	8
2.3.1 Manifestações clinicas	8
2.3.1.1 Manifestações articulares	8
2.3.1.2 Manifestações extra-articulares.....	9
2.3.2 Manifestações laboratoriais	11
2.3.2.1 Proteínas de fase aguda e volume de sedimentação globular.....	12
2.3.2.2 Fatores reumatoides.....	13
2.3.2.3 Anticorpos anti-proteínas citrulinadas	14
2.4 Critérios de classificação	16
2.5 Aspectos etiológicos	18
2.5.1 Fatores genéticos	18
2.5.1.1 Genes do complexo de histocompatibilidade maior	19
2.5.1.2 Outros genes.....	22

2.5.2	Fatores ambientais	27
2.6	Patologia	30
2.6.1	Fase pré-articular	31
2.6.2	Fase de inflamação subclínica	31
2.6.3	Fase articular.....	33
3	Terapêutica farmacológica	37
3.1	Analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides.....	37
3.2	Glucocorticoides	40
3.3	Modificadores da doença reumática	42
3.3.1	DMARDs tradicionais	42
3.3.1.1	Metotrexato	42
3.3.1.2	Leflunomida	45
3.3.1.3	Sulfasalazina.....	48
3.3.1.4	Hidroxicloroquina	49
3.3.2	DMARDs biológicos	50
3.3.2.1	Inibidores do TNF- α	50
3.3.2.2	Inibidores dos recetores de IL-1	56
3.3.2.3	Inibidores dos recetores de IL-6.....	57
3.3.2.4	Depletors dos linfócitos B	59
3.3.2.5	Inibidores da co-ativação de linfócitos T	61
3.3.2.6	Inibidores da janus cinase	62
4	Farmacogenómica do metotrexato	64
4.1	Polimorfismos nos transportadores de influxo	65
4.2	Polimorfismos nos transportadores de efluxo.....	67
4.2.1	Polimorfismos no transportador ABCC1	68
4.2.2	Polimorfismos no transportador ABCB1	69
4.3	Polimorfismos nos genes dos enzimas relacionados com a glutaminação	72

4.3.1	Polimorfismos no gene FPGS.....	72
4.3.2	Polimorfismos no gene GGH	73
4.4	Polimorfismos nos genes dos enzimas alvo do metotrexato.....	74
4.4.1	Polimorfismos no gene da enzima DHFR	74
4.4.2	Polimorfismos no gene da enzima MTHFR	76
4.4.3	Polimorfismos no gene da enzima TYMS.....	83
4.4.4	Polimorfismos no gene da enzima ATIC	86
5	Conclusão	90
6	Bibliografia.....	92

1 Introdução

Apesar do sistema músculo-esquelético ser responsável pelo movimento, este não ocorreria se o organismo não fosse provido de sistema articular, isto é, de articulações.

As articulações são produto da junção de dois ossos e, apesar de serem também responsáveis pelo movimento, muitas das articulações são imóveis ou apenas permitem movimentos de pouca amplitude. Podem ser classificadas não só pelo tipo de tecido conjuntivo que mantém o contacto entre os ossos como também, na existência/ausência de uma cápsula articular contendo líquido sinovial. Baseado nestes parâmetros podemos classificar as articulações como fibrosas, cartilagueas ou sinoviais (1).

Nas articulações fibrosas, os dois ossos encontram-se pelo meio de um tecido conjuntivo fibroso, não apresentam cápsula articular e são imóveis. São exemplo destas articulações, as suturas coronal, sagital e lambdática, linhas de junção dos ossos do crânio (ver figura 1.1) (1).

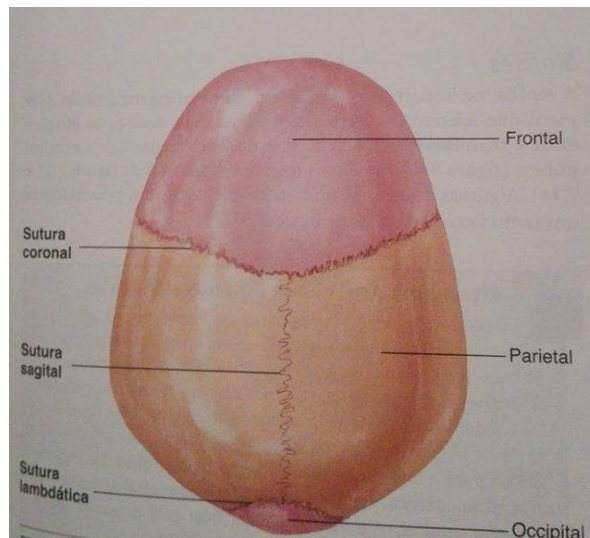


Figura 1.1-Esquema representando uma vista superior das suturas do crânio (adaptado de *Seeley* (1)).

As articulações cartilagueas, tal como o nome sugere, são compostas por tecido fibrocartilagenoso ou por cartilagem hialina. Por fim, as articulações sinoviais apresentam líquido sinovial permitindo assim movimentos de mais amplitude entre os ossos e são anatomicamente mais complexas que as articulações cartilagueas e que as articulações fibrosas (1).

As superfícies articulares dos ossos que se encontram na articulação sinovial estão envolvidas numa cápsula articular, cápsula esta que é composta por duas camadas: uma capsula fibrosa exterior e uma membrana sinovial interior (ver figura 1.2). O líquido sinovial é produzido por esta membrana e consiste num filtrado de soro sanguíneo e secreções de células sinoviais. Este líquido tem como função principal a lubrificação das superfícies articulares (1,2).

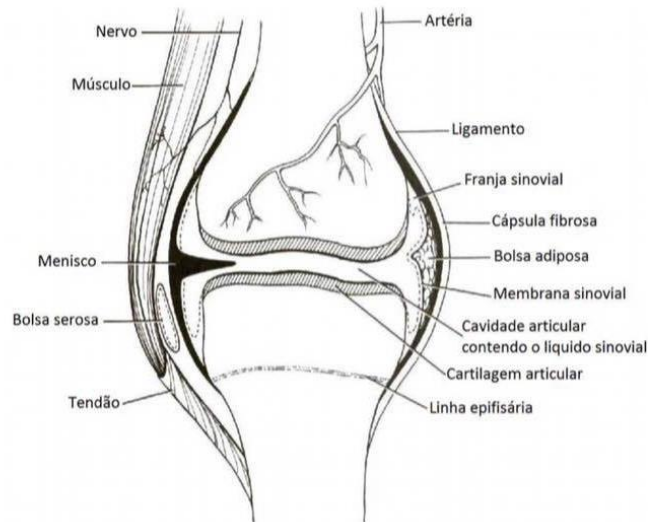


Figura 1.2-Elementos constituintes de uma articulação sinovial (adaptado de *Wright* (2)).

A artrite reumatóide (AR) caracteriza-se por uma doença autoimune que resulta numa destruição progressiva das articulações e dos tecidos que as circundam. É caracterizada como uma doença crónica e que apresenta uma progressão natural lenta e dolorosa, culminando não só no envolvimento do sistema músculo-esquelético como também de vários outros sistemas orgânicos resultando em comorbilidades sistémicas (3).

A farmacogenómica é o estudo de polimorfismos genéticos que podem influenciar a metabolização dos fármacos, levando a alterações de eficácia e de toxicidade nos doentes. Estes polimorfismos podem estar presentes nos genes dos transportadores do fármaco, seja de efluxo ou de influxo e nos genes dos enzimas que metabolizam os fármacos. Quando um gene apresenta variabilidade genética diz-se polimórfico sendo que cada polimorfismo gera uma variante alélica, que poderá alterar a região codificante e consequentemente a estrutura do enzima ou, em alternativa, a transcrição e

consequentemente a expressão do mRNA correspondente, levando a uma maior ou menor atividade ou expressão dos mesmos.

Na presente monografia é realizado, em primeiro lugar, um estudo bibliográfico de todo o quadro clínico do doente de AR, da etiologia da doença, e da sua patogénese. De seguida, são elucidadas as estratégias de terapêutica utilizadas nos doentes, avaliando concomitantemente a eficácia e os efeitos adversos sentidos. Por fim, a monografia culmina no estudo bibliográfico da farmacogenómica assente nas várias enzimas responsáveis pela resposta nos doentes do metotrexato.

2 Artrite reumatoide

2.1 Perspetiva histórica e definição da patologia

Em 1800, *Augustin Jacob Landré-Beauvais*, um jovem médico no asilo *Saltpêtrière* em França, define pela primeira vez a sintomatologia da patologia que atualmente é conhecida como artrite reumatóide (4). Na sua dissertação, descreve detalhadamente a condição clínica de um grupo de pacientes que apresentam dor e edema articular, dificuldades no movimento e uma deformação progressiva nas articulações. *Landré-Beauvais* após análise deste quadro clínico, conclui tratar-se de uma condição que difere da “gota comum”, e dá-lhe o nome de “Gota asténica primitiva” (5). Descreve também as diferenças entre ambas as doenças, salientando a incidência da “Gota comum” maioritariamente nos homens, enquanto que a “gota asténica primitiva” é predominante nas mulheres e aconselha alguns cuidados terapêuticos que eram utilizados na época (4,5).

Outra figura importante foi o médico *Alfred Garrod*, que em 1959 escreve “*Treatise on Nature of Gout and Rheumatic Gout*” onde observa vestígios de ácido úrico nas amostras de sangue de pacientes com “gota comum”, estando estes vestígios ausentes nas amostras de sangue de pacientes padecendo de outras doenças reumáticas. É então que distingue também a “Gota asténica primitiva” da “Gota comum”, afirmando tratarem-se de duas patologias com etiologia distinta (4,6).

Em 1890, *Archibald Garrod*, filho de *Alfred Garrod*, escreve “*Treatise on Rheumatism and Rheumatoid Arthritis*” onde emprega pela primeira vez o termo artrite reumatóide (4). *Archibald Garrod* escreve:

“... Tenho empregue o termo “artrite reumatóide”, não por qualquer convicção de superioridade para com os outros nomes, mas porque é um dos mais amplamente utilizado neste país nos dias de hoje” (7).

Foi também nesta mesma obra que *Garrod* descreve ossadas com o que afirma serem deformações provocadas pela AR. As deformações foram encontradas em vítimas de Pompeia, em cemitérios na Pomerânia e em Roma, e também em esqueletos humanos egípcios. É assim que nasce a teoria de que a AR poderá ser uma doença ancestral e não uma doença da era moderna (4,7)

Esta teoria é apoiada não só por estudos paleontológicos, mas também por algumas peças de arte, como por exemplo, na pintura “*The Painter’s Family*” do ano de 1620 da autoria de *Jacob Jordaens*, ou na pintura de Peter Paul Rubens, um pintor do realismo do século XVII. Rubens retrata em “*The Three Graces*” três mulheres desnudas, sendo que é de passível observação, deformações semelhantes às atualmente consideradas sugestivas de AR na mão da mulher retratada à esquerda (ver figura 2.1.) (4,8).



Figura 2.1-Pintura de *Peter Paul Rubens* intitulada de “*The Three Graces*”. Pintura exposta no Museu Nacional do Prado, Madrid. (adaptado de *Beauvais* (5)).

Já no século XX, o médico americano Charles Scott analisou os esqueletos descritos por *Garrod*, e concluiu que as deformações ósseas são consequências de osteoartrite, espondilite anquilosante e de gota, não havendo nenhuma evidência de se tratar de artrite reumatóide, reafirmando que a AR corresponde a uma patologia da era moderna (4)

Começou assim o debate que permanece até à atualidade e que pretende dar resposta à grande questão: será a artrite reumatóide uma doença ancestral ou uma doença da era moderna?

Devido a uma etiologia, um tanto ou quanto incerta, houve a necessidade de definir quem era portador da doença e quem não era, sendo que foi em 1956 que o comité da Associação Americana de Reumatologia propôs critérios para a definição da doença. Estes critérios estavam assentes nas observações experimentais dos 5 membros da comissão, pelo que, ao longo do século XX e XXI foram sendo reformulados (9).

Em 2010, são publicados os novos e atuais critérios de definição da doença. Estes critérios estratificam a população não só em grupos de portadores ou não portadores, mas também inferem na artrite reumatoide inicial (10).

Ao longo do tempo tentou-se chegar a uma terapêutica eficaz para a doença e em 1940 foi desenvolvido e isolado o primeiro fármaco capaz de levar à remissão da doença. O metotrexato (MTX) foi inicialmente terapêutica contra neoplasias malignas, sendo administrado em doses bastante elevadas, tornando-se tóxico e potenciando episódios de imunossupressão (11,12).

A primeira utilização documentada do metotrexato para o tratamento da AR foi em 1951, mas foi só a partir dos anos 80 que se iniciaram os ensaios clínicos fundamentais para que se verificasse a eficácia do fármaco na doença (12,13). Foi então que em 1988, a *Food and Drug Administration (FDA)*, agência reguladora dos medicamentos dos Estados Unidos da América (EUA), aprova a sua utilização como modificador da doença. Apesar da sua autorização apenas foi utilizado correntemente pelos clínicos nos anos 90 (14).

Após anos de avanço das técnicas de genética recombinante, começa a surgir uma terapêutica revolucionária na doença, os modificadores biológicos da doença reumática (bDMARD, do inglês *biological disease-modifying antirheumatic drugs*). Estes fármacos usados em combinação terapêutica com o MTX, apresentam sinais de potenciar a remissão da doença, pelo que começaram a ser investigados em ensaios clínicos de toxicidade e de segurança, abrindo assim caminho para uma nova era na terapêutica da doença (15).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde, define AR como uma doença crónica debilitante, que afeta as articulações, tendões, músculos, tecidos conjuntivos e tecidos fibrosos e que provoca dor e deformação. Está incluída no grupo de doenças músculo-esqueléticas que podem provocar grandes impactos na sociedade e nos próprios doentes, levando a grandes despesas de saúde bem como a possibilidade de incapacidade para exercer atividades profissionais (16).

2.2 Dados epidemiológicos

Para qualquer doença, a epidemiologia é uma ciência que oferece ferramentas úteis para estudar o impacto da patologia na população, por forma a inferir tanto em

medidas de auxílio ao doente pela medicina, como na busca de fatores etiológicos para conhecimento aprofundado dos fatores causais e dos fatores não-causais.

Na AR estes estudos epidemiológicos tornam-se fulcrais para um entendimento não só da patologia como também do que dela advém. Os doentes de AR apresentam uma taxa de mortalidade 50% maior que a população na sua generalidade, não unicamente pela doença, mas principalmente pelas várias afeções que desencadeiam devido a um estado de saúde débil. Estas afeções são maioritariamente, doenças do foro cardiovascular e infeções oportunistas que evoluem num estado de imunossupressão (17,18).

Esta doença manifesta-se pelo globo inteiro e apresenta uma incidência de 0,5-1%. É de referir que esta incidência não é homogênea entre as diversas populações mundiais (ver figura 2.2) nem mesmo entre os géneros, sendo mais comum nas mulheres do que nos homens, com uma taxa de 3:1 (16,19).

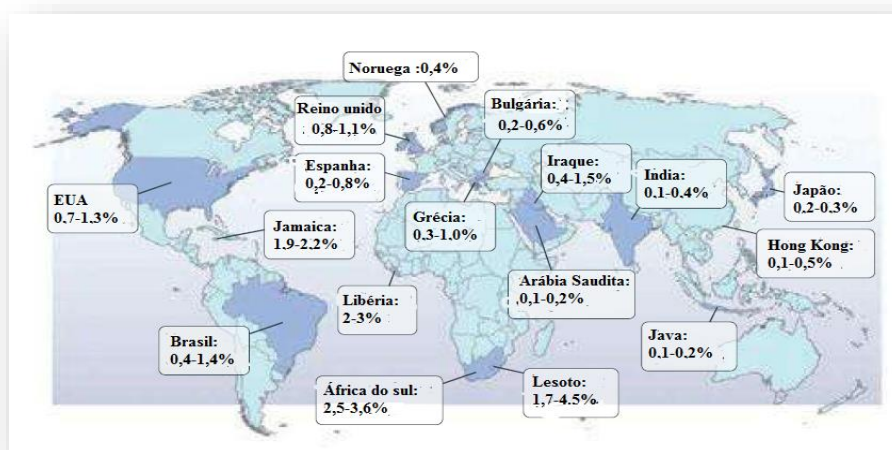


Figura 2.2-Incidência global da AR (adaptado de Kasper (28)).

Apesar de uma incidência global baixa, como se trata de uma doença de progressão longa e lenta, leva a taxas de prevalência altas (18).

Em Portugal os dados epidemiológicos na AR são poucos e contraditórios, sendo que neste momento não existem dados credíveis para uma conclusão geral da incidência e prevalência desta patologia no território português. Não obstante, Costa *et al*, através de uma entrevista a moradores da cidade do Porto, calculou uma prevalência autodeclarada de 1.6%, sendo que para as mulheres a prevalência foi de 2.5% e para os

homens 0,0 % (20). Embora não estejam bem definidos estes parâmetros, a incidência e prevalência da doença aproxima-se de outros países do sul da Europa, cerca de 3% (21).

Alguns estudos avaliaram qual o valor de despesas de saúde relacionadas indireta e diretamente com a doença, englobando consultas de especialidade, terapêutica farmacológica, material radiológico e material empregado nas análises laboratoriais, transporte de urgência para o hospital, intervenções cirúrgicas e despesas com as afeções extra-articulares. E estima-se que nos EUA se gaste em despesas de saúde por paciente 2000 a 10,000 dólares por ano, custos estes que tendem a aumentar com a utilização de medicamentos biológicos inovadores (23, 24).

Já em Portugal os custos são fundamentados também pelos tratamentos farmacológicos crónicos com elevada tecnologia biológica e farmacêutica, como os modificadores da doença, cirurgias reconstrutivas das articulações afetadas, reabilitação física, dias de trabalho perdidos pelo próprio e pelos familiares que os acompanham e reformas antecipadas por incapacidade para o trabalho. E estima-se que em média o custo de um paciente em remissão por ano ronde os 2.205 €, enquanto que um paciente com uma doença ativa tem um custo por ano de 5.634 € (24).

2.3 Quadro clínico

Sendo caracterizada como uma patologia crónica e debilitante, a medicina tem como objetivo retardar a progressão natural da doença, como tal é fulcral que seja realizado um diagnóstico correto e o mais precoce possível. Para tal, é recomendado uma análise rigorosa da história clínica do doente e da sua sintomatologia, proceder a um exame físico minucioso e à aquisição de análises laboratoriais específicas (25,26).

2.3.1 Manifestações clínicas

2.3.1.1 Manifestações articulares

Grande parte dos doentes apresentam um início de doença insidioso levando a processos inflamatórios articulares, designados por sinovites (27). A inflamação pode ser caracterizada como sinovite monoarticular, quando afeta apenas uma articulação ou como sinovite poliarticular, quando está presente em múltiplas articulações (27,28).

A sinovite poliarticular é a forma típica de manifestação da doença, apresentando uma distribuição simétrica e um predomínio distal envolvendo primeiramente as articulações de dimensões reduzidas e só posteriormente as articulações maiores (26).

São frequentemente afetadas, numa fase precoce da doença, as pequenas articulações, isto é, os punhos e os dedos das mãos, particularmente as metacarpofalângicas (MCFs), as interfalângicas proximais (IFPs) (Ver figura 2.3) e a metatarsofalângicas (MTFs), enquanto que numa fase avançada ocorre destruição das grandes articulações, os ombros, joelhos, cotovelos e ancas (26,28).

Estas poliartrites são acompanhadas por tumefação e dor, que resultam tanto da pressão como do movimento articular. É igualmente sentida rigidez articular e ocorre entrada de fluidos oriundos do processo inflamatório nas articulações instigando assim, ao edema. Esta rigidez articular é particularmente intensa pela manhã, e pode ter uma duração de uma hora, sendo um dos sinais mais característicos de AR (26,27).



Figura 2.3-Deformações nas articulações metacarpofalângicas (Adaptado de Seeley (1)).

2.3.1.2 Manifestações extra-articulares

Por ser uma doença sistémica a AR apresenta manifestações clínicas não só articulares como também manifestações que se estendem ao organismo inteiro, levando a sintomas de vertente sistémica (28).

Numa fase precoce a sintomatologia da doença é bastante generalizada, podendo ser desconsiderada pelos doentes. As manifestações iniciais são: perda de peso, fadiga muscular, astenia (sensação de debilidade corporal) que pode ser acompanhada de febrícula, artralgia sem processo inflamatório e uma sensação de “formigueiro” nas extremidades, que embora de predomínio noturno também pode ocorrer durante o dia (25,27).

Ao longo da progressão da doença e sobretudo em doentes com baixa adesão à terapêutica e/ou com a patologia não controlada, poderão surgir comorbilidades extra-articulares, que aumentam tanto a morbidade como a mortalidade associadas à AR (29).

Uma das manifestações extra-articulares (MEA) mais frequentes nos doentes, são os nódulos reumatóides. Estes nódulos são mais incidentes em doentes com o fator reumatoide (FR) positivo e em abundância no plasma (30). Os nódulos apresentam um desenvolvimento subcutâneo, isto é, localizam-se em tecido celular subcutâneo, podem ser encontrados maioritariamente em zonas no corpo que suportam maior pressão ou



Figura 2.4- Presença de nódulos reumatóides no cotovelo de doente de artrite reumatóide (Adaptado de *goldman-cecil* (26).

irritação cutânea, tal como os calcanhares, cotovelos, dedos, glúteos e as orelhas (ver figura 2.4). Mas também estão presentes nos órgãos internos, como a pleura, pulmões e o pericárdio, nas cordas vocais, vértebras e no tendão de Aquiles (27,31). Histologicamente apresentam um núcleo necrótico composto por fibrina e colagénio, circundado por uma malha de macrófagos, fibroblastos e linfócitos (27,30). À palpação apresentam uma consistência firme e geralmente são de natureza benigna não sendo necessária uma abordagem terapêutica (27,28).

No sistema pulmonar a manifestação mais frequente é o derrame pleural. O seu aparecimento é típico de uma AR numa fase avançada, mas pode manifestar-se numa fase inicial e assintomática da doença (32,33). O exsudativo característico das infiltrações pleurais reumatóides é habitualmente unilateral (ver figura 2.5), com um pH entre os 7 e os 7.13, tem um baixo teor de glucose e um alto teor proteico, proveniente do enzima desidrogenase láctica (DHL). Estão presentes um grande número linfócitos e de neutrófilos (33,34). Embora frequentemente assintomático, o envolvimento pleural pode ser acompanhado por sinais de dor torácica, tosse seca e por dispneia (28).



Figura 2.5-Imagiologia por Raio-X do derrame pleural no pulmão direito. (Adaptado de *Emmungil* (34)).

Por fim é de elevada importância referir as MEA que afetam o sistema cardiovascular. Neste contexto, assume relevância particular a pericardite. Esta condição é caracterizada pela inflamação da membrana que cobre o coração, o pericárdio e normalmente não apresenta sintomatologia associada. A pericardite raramente é tida como um sintoma de AR, pelo que é instalada normalmente aquando de uma AR estabelecida e avançada. Apresenta-se como uma complicação da doença com correlação positiva com o FR e apresenta uma incidência mais elevada em pacientes fumadores (27,31). Nos casos sintomáticos, caracteriza-se por uma dispneia e dor no coração (precordialgia), pode ser estudada ecocardiograficamente, onde é possível detetar a existência de um volume, embora reduzido, de derrame pericárdico (27).

2.3.2 Manifestações laboratoriais

Com o processo de inflamação exacerbado sentido na AR, é natural que, após um estudo hematológico completo, os doentes apresentem uma colossal quantidade de marcadores inflamatórios (25).

Laboratorialmente, as principais características da doença são: anemia, elevação das proteínas de fase aguda e da velocidade de sedimentação globular (VSG), hipergamaglobulinémia e a presença de anticorpos específicos para a patologia, tais como

o FR e os anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPA, do inglês *anti-citrullinated protein antibody*) (27,35).

2.3.2.1 Proteínas de fase aguda e volume de sedimentação globular

A resposta de fase aguda (RFA) de um processo inflamatório é definida como a libertação de mediadores e citocinas pelas células ativadas do sistema imunitário, originando cascatas reacionais metabólicas fulcrais para o processo inflamatório (36).

Na sinovite reumatóide ocorre uma libertação mediada por macrófagos e monócitos sinoviais, de mediadores pré-inflamatórios, nomeadamente, do fator de necrose tumoral α (TNF- α do inglês, *tumor necrosis factor α*). Este, produz mediadores inflamatórios como as interleucinas (IL), nomeadamente, IL-1 e IL-6. A IL-6 é de grande importância na expressão da inflamação. Esta ingressa na corrente sanguínea e aquando da sua passagem pelo fígado, altera o padrão hepático de síntese proteica, ocorrendo assim, uma estimulação da produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, principalmente, a proteína C-reativa (PCR) (28,37).

A PCR é uma proteína de resposta rápida aos processos inflamatórios no organismo, isto é, há uma relação diretamente proporcional entre os seus níveis plasmáticos e o nível de inflamação provocado por uma patologia. Aliado a esta cinética, é de salientar que a PCR apresenta um tempo de semivida de 19 horas, pelo que, quando o clínico pede um estudo de doseamento da PCR existe a garantia de que os níveis encontrados no plasma correspondem a uma inflamação atual (27,38).

Como referido anteriormente, outro parâmetro laboratorial que poderá estar alterado na AR é a velocidade de sedimentação globular. Especula-se que exista uma correlação da VSG com a extensão da lesão poliarticular presente nos doentes, pelo que é considerado um exame complementar para o diagnóstico e evolução da doença (39,40).

Apesar de grande parte dos doentes de AR apresentarem valores elevados de PCR e VSG, a sensibilidade e especificidade destes parâmetros é baixa por comparação a outros biomarcadores da doença (41). Num estudo publicado em 2014, com uma amostra de 9135 pacientes com AR diagnosticada e fundamentada, concluiu-se que a correlação com os valores de PCR e VSG não é fidedigna, uma vez que 58.08% dos pacientes não apresentam disparidade nestes parâmetros (42).

Não obstante estes marcadores não deverem ser interpretados sem um contexto clínico, são ferramentas proveitosas para o auxílio do diagnóstico e monitorização da evolução da doença.

2.3.2.2 Fatores reumatóides

Na AR a perda da tolerância ao próprio organismo, formando antigénios (Ag's) representa o passo precursor para que o fenómeno autoimune se desenvolva e se manifeste. Por este motivo, é espectável que existam diversos tipos de anticorpos (Ac's) nas análises laboratoriais dos pacientes (43).

Como anteriormente descrito, foi na década de 90 que a importância dos FR no diagnóstico e prognóstico da AR começou a ser estabelecida, sendo atualmente um parâmetro analítico de grande peso da presença da doença (43).

Os FR são uma família de autoanticorpos que se ligam com a porção Fc da imunoglobulina G (IgG). Podem estar presentes em grande parte das doenças autoimunes, como o Lupus eritematoso sistémico e em doenças inflamatórias agudas, no entanto são encontrados de uma forma mais exacerbada na AR. Os FR estão presentes em cerca de 60-80% dos doentes, nas isoformas FR-IgM, FR-IgG e FR-IgA, no entanto é a isoforma FR-IgM que tem incidência maioritária na doença (cerca de 75-80%), com títulos plasmáticos superiores a 50 IU/ml (28,43,44).

Num estudo retrospectivo, Rantapaa-Dahlqvist et al. (45) demonstraram que num total de 83 indivíduos que não apresentavam sintomas da doença, no estudo retratado como pré-pacientes, 16.9% destes pacientes apresentavam nas amostras de sangue FR-IgG, 19.3% apresentavam FR-IgM e 33.7% apresentavam FR-IgA, o que demonstra que é possível apresentar este biomarcador antes mesmo de ter alguma manifestação articular da doença. Tais factos realçam a importância destes biomarcadores no diagnóstico e no rastreio pré-sintomático da doença (ver figura 2.6).

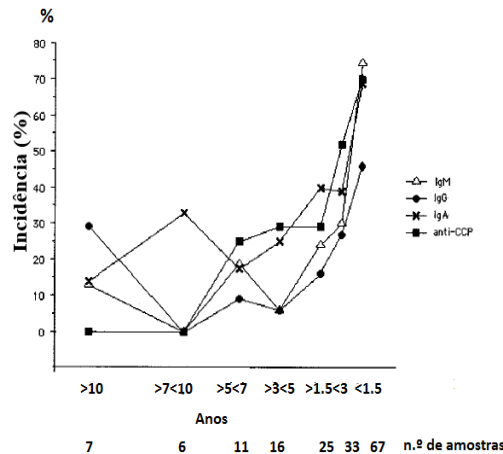


Figura 2.6-Incidência de anticorpos no plasma sanguíneo ao longo do tempo. Análise feita antes da sintomatologia (adaptado de *Rantapää-Dahlqvist* (45)).

2.3.2.3 Anticorpos anti-proteínas citrulinadas

Proteínas como a queratina, a vimentina, o fibrinogénio/fibrina, o colagénio tipo II e a α -enolase são passíveis de sofrer reações de citrulinação sendo reconhecidas como “non-self”, tornando-se Ag’s-alvo para o sistema imunitário. São assim produzidos vários anticorpos específicos para cada uma destas proteínas, tais como os anticorpos anti-queratina, os anticorpos para a vimentina citrulinada e anticorpos anti-colagénio II e anti- α -enolase. Todos estes anticorpos reconhecem proteínas citrulinadas e como tal, são coletivamente designados anticorpos anti proteínas citrulinadas (ACPA) (44,46).

Estes AC’s, assim como os FR, podem estar presentes no plasma sanguíneo de forma precoce, havendo mesmo evidência da sua presença 10 a 14 anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas da doença. O ACPA, é por isso, o biomarcador de maior relevância e interesse para o diagnóstico da patologia, pois apresenta uma elevada especificidade (cerca de 95%) e uma grande sensibilidade (até 67%). (26,41).

Como já enunciado, estes AC’s são específicos para as proteínas submetidas a um processo de citrulinação, denominadas por péptidos citrulinados cíclicos (CCP, do inglês *cyclic citrullinated peptid*). A citrulinação advém de uma reação enzimática após a tradução proteica e é catalisada por uma família de enzimas, as peptidil arginina desaminases (PAD), sendo que na AR as isoenzimas relevantes são a PADI2 e a PADI4 (47–49).

Esta reação enzimática ocorre sobretudo no meio intracelular de leucócitos do tipo granulócitos que estão em apoptose. Estas células estão a perder os seus processos homeostáticos, apresentando grandes trocas extracelulares de cálcio, não este que é essencial para a reação de citrulinização. Como na AR ocorre uma apoptose excessiva destes leucócitos e a fagocitose não é suficiente para controlar a libertação das CCP, estas são reconhecidas como proteínas exógenas e são captadas pelas células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês, *antigen presenting cells*), dando início ao processo autoimune (44,50). Nesta modificação enzimática, ocorre uma substituição de uma arginina (Arg) da proteína por um novo aminoácido (AA), a citrulina (ver figura 2.7).

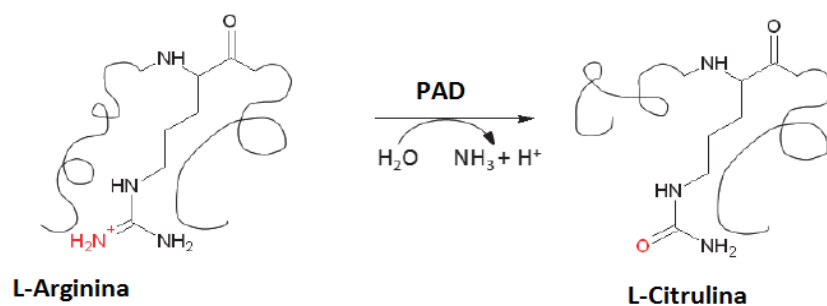


Figura 2.7-Esquema da reação enzimática de citrulinização. (Adaptado de Wegner (46)).

As argininas são dotadas de cargas positivas, formando ligações intramoleculares de pontes de hidrogénio, tendo assim, um contributo importante para a preservação da estrutura terciária proteica. Aquando da citrulinização, estes AA são modificados, levando à perda das cargas positivas e à desnaturação proteica pela disrupção das ligações intramoleculares (ver figura 2.8). É com esta alteração estrutural e funcional da proteína que é ativado o sistema imunitário, uma vez que o organismo perde a tolerância e reconhece as CCP como “non-self”.(49).

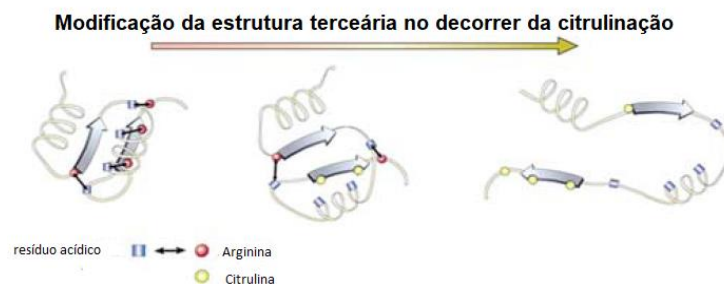


Figura 2.8-Disrupção das ligações intramoleculares e consequente desnaturação proteica (Adaptado de Suzuki (49)).

Relacionado com a presença/ausência de ACPA no plasma os doentes são divididos em dois grupos, os ACPA-positivos e os ACPA-negativos. Esta diferença serológica está relacionada com a contribuição de fatores genéticos na etiologia da doença (50). Estes fatores genéticos serão abordados mais adiante nesta dissertação.

2.4 Critérios de classificação

Com o objetivo de definir quais os indivíduos que são doentes de AR e os que não são doentes, em 1987 foram criados pela Associação Americana de Reumatologia, critérios de classificação da doença (9). Estes critérios são uma reformulação dos critérios de 1956, e têm por base científica, ensaios clínicos com uma população de doentes de AR diagnosticada por médicos reumatologistas, recrutados para este efeito e com uma população de pacientes controlo, isto é, sem AR. São uma ferramenta muito útil para a distinção de uma AR bem estabelecida e ativa, de outras patologias do foro reumático (9).

É de salientar que estes critérios apresentam algumas limitações, nomeadamente, a impossibilidade de identificar pacientes com AR inicial e de diferenciar uma combinação de doenças do foro reumático. Devido a estas limitações, um grupo de trabalho composto por membros do Colégio Americano de Reumatologia (ACR, do inglês American college of rheumatology) e da Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR do inglês, *European League Against Rheumatism*), definiu novos critérios, remetendo os critérios anteriores para o passado (9,10).

Nasceram assim os critérios de 2010, nos quais, os pacientes são agrupados de forma uniformizada, o que permite aos especialistas diagnosticarem a doença numa fase inicial (ver quadro 2.1) (10). Para a classificação é imprescindível escolher pacientes elegíveis para satisfazer os critérios, e para tal, é obrigatória a presença de pelo menos uma articulação com sinovite, sendo que esta não pode ser justificada por outra doença (10).

Tabela 2.1-Critérios de classificação da artrite reumatóide ACR-EULAR (2010) (adaptado de *Aletaha* (10)).

Envolvimento articular	
1 articulação grande	0
2-10 articulações pequenas	1
1-3 articulações pequenas	2
4-10 articulações pequenas	3
>10 articulações (pelo menos uma articulação pequena)	5
Sorologia (pelo menos o resultado de um teste é necessário para classificação)	
Fator Reumatóide negativo e anticorpos anti proteínas citrulinadas negativos	0
Fator Reumatóide positivo em título baixo ou anticorpos anti proteínas citrulinadas positivos em título baixo	2
Fator Reumatóide positivo em título alto anticorpos anti proteínas citrulinadas positivos em título alto	3
Provas de fase aguda (pelo menos o resultado de um teste é necessário para classificação)	
PCR normal e VSG normal	0
PCR anormal e VSG anormal	1
Duração da sintomatologia	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

A aplicação destes critérios é baseada numa pontuação final, que corresponde ao somatório de diversos pontos conforme o indicado em cada domínio. A pontuação máxima são de 10 pontos, sendo que, com 6 ou mais pontos é considerado AR. Já um paciente com uma pontuação abaixo de 6 não pode ser diagnosticado com a doença, mas isso não quer dizer simbolizar que este não venha a preencher os restantes critérios (10).

Após o diagnóstico da doença é uma prática comum e bastante útil classifica-la conforme o DAS28 (*Disease Activity Score 28*). Trata-se de um índice que é calculado conforme a atividade da doença, tendo em conta para o cálculo a contagem das articulações dolorosas (0 a 28), as articulações tumefactas (0 a 28), os marcadores de inflamação (VGS ou PCR) e a avaliação global da doença referida pelo doente (51). Após a ponderação destes critérios, ocorre a conversão desta informação numa medida contínua que vai de 0 a 9,4 (51).

Assim, com o índice $DAS28 \leq 3.2$ o doente apresenta um nível de atividade da doença baixo, com $3.2 < DAS28 \leq 5.1$ apresenta uma atividade moderada, e com um $DAS28 > 5.1$ uma atividade alta, para o doente estar em remissão da doença o seu índice DAS28 tem de ser inferior a 2,6 (51).

Em ensaios clínicos esta classificação é uma mais valia, uma vez que assim os pacientes são classificados e uniformizados segundo este índice. Também é rotineiro utilizar os índices ACR20/50/70, sendo que estes índices indicam uma melhoria de 20%, 50% e 70% no envolvimento global da doença e dos sinais e sintomas da mesma, podendo ser um indicativo de mudança da DAS28 (10,52).

2.5 Aspetos etiológicos

Atualmente chegou-se a um consenso quanto à etiologia da AR, caracterizando-a como uma doença resultante de uma interação de fatores genéticos e de fatores ambientais. Tal associação resulta numa patologia complexa e multifatorial, um verdadeiro “triângulo das bermudas” da genética (53,54).

A componente fatorial genética da AR pode ser dividida em dois grandes grupos: 1) genes do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e 2) genes não-MHC.

2.5.1 Fatores genéticos

De facto, comprovou-se que em cerca de 60% dos estudos clínicos de ordem genética com irmãos gémeos, ocorre um aparecimento da doença derivada de fatores genéticos hereditários, sendo encontrados atualmente, mais de 100 *loci* diferentes associados à incidência da patologia, onde grande parte dos SNP (do inglês *single nucleotide polymorphism*) recai sobre a população caucasiana (55).

2.5.1.1 Genes do complexo de histocompatibilidade maior

O MHC é um conjunto de genes presentes no cromossoma seis, com a função de produzir antigénios leucocitários (HLA, do inglês *human leucocyte antigen*) e assim combater as agressões externas ao organismo. Assim, o MHC é usualmente designado por MHC-HLA e pode-se dividir em duas classes: a classe I e a classe II. Diversos genes MHC são fundamentais na imunidade adaptativa, fazendo a “ponte” entre a imunidade dita inata e a imunidade adaptativa (56).

Estes genes produzem proteínas MHC que estão presentes à superfície das APC, que ao reconhecerem péptidos, quer endógenos (no caso do MHC I, através de uma via citosólica) quer exógenos (o MHC II, pela via endocítica), ligam-se a recetores específicos dos linfócitos. As moléculas MHC I ligam-se aos recetores das células T (TCR) CD8+ dos linfócitos Tcitotóxicos (TC) e as MHC II aos recetores TCR CD4+ dos linfócitos *Thelper* (Th) produzindo posteriormente células Th de memória e Ac's no sangue periférico (57).

Na etiologia da AR destaca-se o MHC II, pois apresenta uma região genómica altamente polimórfica, na qual foram identificadas variantes genéticas de extrema importância para a doença (58). É na região codificante dos genes do MHC II, que são encontrados polimorfismos importantes na etiologia genética da AR. A contribuição genética desta região é de 11%, sendo assim a região com maior importância e contribuição tanto para a suscetibilidade de desenvolvimento da doença, como para um aumento da severidade da mesma (54,59).

Foi no final da década 70 que Stastny P. (60), num grupo de 80 indivíduos caucasianos caracterizados como doentes pelos critérios de classificação do ACR, verificou que cerca de 54% destes indivíduos eram portadores de uma variante no gene HLA-DR4 do complexo genómico HLA-DRB1. Este gene é responsável pela produção de moléculas HLA-DR4, sendo que a variante em causa (HLA-DRB*04) origina a proteína HLA-DRw4 (61).

Posteriormente não só foi verificada e confirmada a associação de *Stastny P*, como também foram descobertas mais algumas variantes neste gene, responsáveis por outros subtipos de HLA (DRw4, DRw10, DRw13, DRw14 e DRw15), que numa nomenclatura simplificada, são concomitantemente nomeados HLA-DR4 (62).

Wordsworth P, et al (62) associaram estes antígenos com a suscetibilidade da doença, concluindo que dependendo da variante alélica, o risco de desenvolver a doença, era maior ou menor. Assim, os heterozigotas DRw4/DRw14 apresentam um risco relativo (RR)= 49 de desenvolver AR ($P<0.00001$) enquanto que os homozigotas DRw4/DRw4 apresentam um RR=15 ($P<0.00001$). Conclui-se assim que os portadores dos alelos DRw14 apresentam um RR superior aos portadores de alelos Dw4 (62).

De acordo com *Jawaheer D. et. al* (63), num estudo com gémeos monozigotas diagnosticados segundo os critérios do ACR, verificou-se que os portadores de dois alelos mutados, isto é, os homozigotas para diversas variantes específicas do HLA-DR4, apresentavam um risco de desenvolver a doença sete vezes maior que os indivíduos que não apresentavam alelos mutados no seu genoma. Neste estudo concluiu-se igualmente que os homozigotas para as variantes apresentam durante mais tempo, uma maior suscetibilidade de adquirir a doença por comparação aos homozigotas *wild-type* (DR4-/DR4-) (ver figura 2.9)) (63).

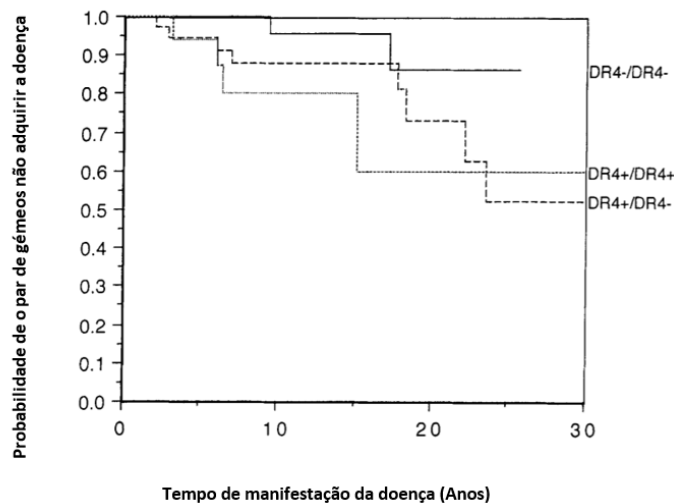


Figura 2.9-Probabilidade ao longo do tempo dos pares de gémeos desenvolverem artrite reumatóide. (Adaptado de *Jawaheer* (63)).

Estudos mais recentes identificaram que não é apenas os alelos HLA-DR4, mas também que o gene HLA-DR1 é altamente polimórfico. Estes alelos são responsáveis pela produção de moléculas de MHC, que pela sua função essencial no sistema imunológico, têm uma importância colossal no processo etiológico da AR, podendo ser

associado à componente autoreativa ao nível das células T, própria da doença (28,59,64,65).

Gregersen *et al*(28) através da comparação de sequências de AA das moléculas de MHC originadas pelas diversas variantes alélicas (HLA-DR1*X) da família HLA-DRB1, formulou a hipótese dos “epítomos partilhados” (EP), na qual concluiu que os SNP resultam numa modificação das proteínas expressas, mais propriamente, nos resíduos de AA encontrados nas posições 70-74, da terceira região hipervariável da cadeia DRB1, resultando em sequências conservativas (QKRAA/QRRAA/RRRAA) nos antígenos formados (ver figura 2.10) (28).

Variante HLA-DRB1*	Posição do AA				
	70	71	72	73	74
*0101	Q	R	R	A	A
*0102	Q	R	R	A	A
*0401	Q	K	R	A	A
*0404	Q	R	R	A	A
*0405	Q	R	R	A	A
*0408	Q	R	R	A	A
*1001	R	R	R	A	A
*1402	Q	R	R	A	A

Figura 2.10-Epítomos codificados pela terceira região hipervariável associados à doença. K= Lisina; R= Arginina; A= Alanina; E= ácido glutâmico (adaptado de *Kasper* (28)).

Após a formulação desta hipótese, correlacionou-se o nível de suscetibilidade à doença com a variabilidade e posição específica do AA alterado pelo polimorfismo. Na posição 71, uma lisina (K) confere um alto risco de desenvolvimento da doença (OR= 2,0), uma arginina (R) confere um risco intermédio (OR=0,97), enquanto que uma alanina(A) ou um ácido glutâmico (E), conferem um risco diminuto (OR=0,59 e 0,32 respectivamente). Já na posição 70, glutamina (Q) e R, conferem um risco mais elevado (54,66).

Em termos de risco global, as variantes que acrescentam risco de desenvolvimento da AR são: no gene HLA-DR4 as variantes HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0408 e HLA-DRB1*0410 e no gene HLA-DR1, as variantes HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0102, HLA-DRB1*1001 e HLA-DRB1*1402 (67,68).

A presença desta variabilidade genética está intimamente relacionada com a produção dos AC's específicos desta doença, como tal, um grande conjunto de estudos comprovam que os indivíduos portadores de haplótipos das variantes HLA-EP estão predispostos a uma produção de ACPA, e como tal, apresentam um fenótipo ACPA-positivo (69–71).

Já para o fenótipo ACPA-negativo, ou seja, doentes que não possuem produção destes AC's, ainda não há consenso sobre SNP's relacionados com os genes HLA, pelo que é necessário investigação nesta temática (72).

2.5.1.2 Outros genes

Já foram confirmados 31 *loci* não-MHC que potenciam a suscetibilidade de desenvolver AR, sendo de destacar o gene que codifica uma proteína intracelular, designada por tirosinafosfatase não-recetor 22 (PTPN22). Este gene encontra-se no cromossoma 1p13.3-13.1 do genoma humano. Neste foi descoberto em 2004 um SNP, que agrega um risco acrescido de desenvolver diabetes tipo 1 (73). Apesar de constituir um peso menor que as variantes HLA para a doença, também foi demonstrada a correlação com outras doenças autoimunes como a AR, doença de Graves, doença de Addison, entre outras (54,74).

O envolvimento desta proteína nas diversas doenças autoimunes, poderá estar associado à sua função no sistema imunitário. Esta enzima é expressa em células hematopoiéticas do sangue periférico, em maior quantidade nas células *natural killers* (NK), neutrófilos e linfócitos Tc. Já nos linfócitos B e linfócitos Th tem uma menor expressão (75). A Lyp (como também é conhecida) é uma enzima composta por 807 AA, que contem, na sua extremidade C-terminal, quatro regiões ricas em prolina, P1-P4 e na extremidade N-terminal o domínio proteico tirosinafosfatase (PTP do inglês protein tyrosine phosphatase) e está envolvida sinergicamente com o enzima intracelular Lck na regulação da inativação de linfócitos T (76).

A ativação dos linfócitos T dá-se após o reconhecimento do Ag pelo TCR, o que leva a complexas reações em cascata, no chamado TCR “signalossoma”. Este espaço intracelular está situado na membrana plasmática da célula T e é constituído por um grande número de elementos enzimáticos. Para que ocorra proliferação dos linfócitos T CD8+ e dos linfócitos T CD4+, a Lck fosforila o seu próprio resíduo tirosínico 394, mudando para uma conformação ativa, ativando concomitantemente os imunorreceptores

de tirosina (ITAM , do *inglês immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), que servem como locais de ligação para uma enzima homóloga à Lck, a ZAP70, que amplia os sinais para os fatores de transcrição responsáveis pela proliferação dos linfócitos T (77).

Quando há necessidade de inibição do sinal do TCR, forma-se o complexo Lyp-Lck, que resulta da ligação do domínio P1 da extremidade C-terminal da Lyp com o domínio SH3 do Lck. Após a formação do complexo enzimático, a Lyp promove a fosforilação do resíduo de tirosina 505 e a desfosforilação do resíduo tirosina 394 do Lck, inibindo os ITAM e o enzima ZAP70. Ocorre assim o término da ativação dos TCR (76–78).

Na presença do SNP rs2476601, ocorre uma mutação de transição, neste caso, uma substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 1858 da região codificante da proteína, levando a uma alteração de uma arginina (Arg) por um triptofano (Trp) no codão 620 do exão 14 da proteína e consequentemente à alteração estrutural do enzima Lyp, conduzindo à formação da variante PTPN22*620 (78–80). Esta alteração estrutural, contrariamente ao que se expectava, leva a um ganho de função da enzima, ou seja, a Lyp620*W (designação para os genótipos 1858C/1858T e 1858T/1858T) apresenta uma atividade inibitória maior dos TCR, do que a Lyp620*R (designação utilizada para o genótipo 1858C/1858C), como foi passível de análise no *Vang et.al.* Neste artigo foi correlacionada a taxa de atividade do enzima luciferase com o nível de expressão das várias isoformas da Lyp. É de salientar que nestes ensaios repórter, a luciferase resulta da atividade dos fatores nucleares da ativação do TCR, e por isso, tem a sua expressão aumentada com a ativação deste recetor. Como a Lyp620*W apresenta maior efeito inibitório deste mecanismo face à Lyp620*R, a atividade da luciferase vai diminuindo com o aumento da expressão da LYP620*W (ver figura 2.11), como consequência da cessação da ativação linfocítica (80,81).

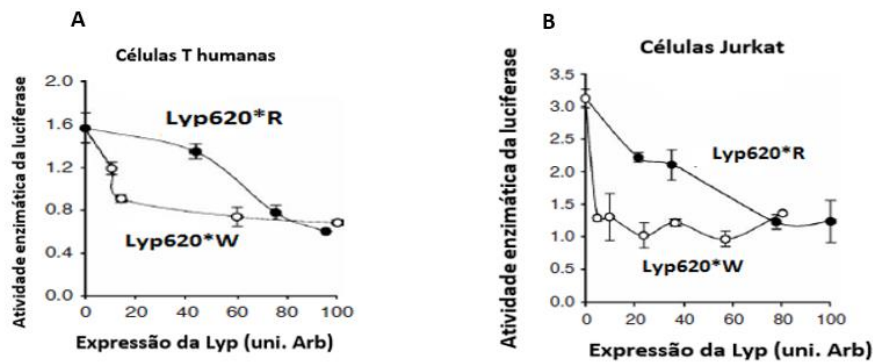


Figura 2.11- **A**-Taxa de ativação da luciferase dependente da expressão das isoformas da Lyp, em células humanas da linhagem T. **B**- Taxa de ativação da luciferase dependente da expressão das isoformas da Lyp, em células da linhagem *Jurkat* (Adaptado de *Vang* (81)).

Apesar do seu mecanismo subjacente a este ganho de função permanecer desconhecido, a variante PTPN22*620 foi correlacionada com o aumento da suscetibilidade de AR em caucasianos. Diversos estudos comparam doentes de AR com indivíduos controlo, chegando à conclusão que ser portador da variante, isto é, tanto indivíduos 1858C/1858T como 1858T/1858T, apresentam um maior risco de sofrer da patologia por comparação aos controlos. Não obstante, conclui-se ainda que indivíduos 1858C/1858T, apresentam um risco maior de sofrer da patologia comparando com os indivíduos homocigotas 1858T/1858T. Os indivíduos ditos *wild-type*, ou seja, os que não possuem a variante apresentam um risco mais pequeno, visto que a frequência deste genótipo está diminuída no grupo dos pacientes (75,78,80,82,83).

Para além do gene PTPN22, está evidenciado outro gene com alguma importância na patologia, o gene que codifica o fator de necrose tumoral α . O TNF- α é um fator pró-inflamatório que está envolvido no processo inflamatório em sinergia com outras citocinas e fatores de crescimento. Este fator é produzido por macrófagos ativados, e em sinergia com a interleucina 1 (IL-1) ativa a expressão de moléculas de adesão e a secreção de outras citocinas, induz a diferenciação das células precursoras imaturas em monócitos, provoca a agregação e ativação de neutrófilos, é co-ativador dos linfócitos T e contribui para a libertação de enzimas proteolíticas das células, contribuindo para a lesão tecidual (38,59,84).

Devido ao seu grande papel na atividade inflamatória, bem como a localização do gene TNF no cromossoma 6 entre os genes do MHC III, não foi descabido, o estudo atento de certos polimorfismos que poderiam estar indicados na etiologia da doença. De facto, foram encontradas concentrações mais elevadas de citocinas e mediadores inflamatórios no sangue periférico dos doentes de AR, pelo que é relevante esta abordagem etiológica (85).

Assim, estudos comprovaram a existência de vários polimorfismos neste gene que afetam a transcrição, e consequentemente a expressão proteica (ver figura 2.11). O primeiro a ser descrito foi um SNP na posição -308, no qual ocorre a substituição de uma G por uma A. Origina um fenótipo caracterizado por uma sobreexpressão de moléculas de TNF- α e um risco maior de desenvolvimento da doença, levando a uma sobreativação de citocinas inflamatórias e uma erosão acrescida das articulações (85–87).

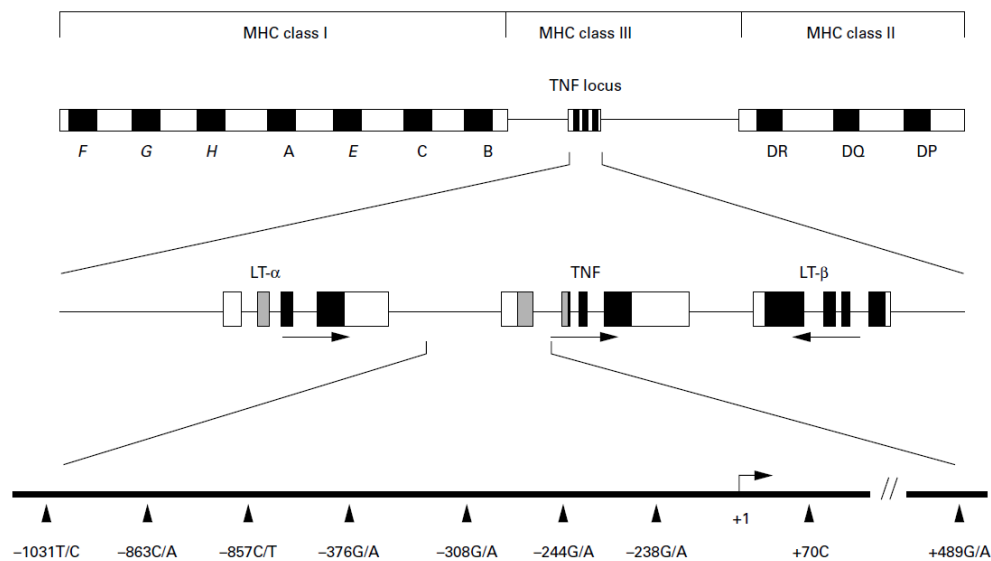


Figura 2.12-Esquema da localização do gene TNF no MHC e dos SNP's com importância para a patologia (adaptado de Verwiej (85)).

Os polimorfismos -1031 T/C, - 863 C/A, -857 C/T e +1304 G/A podem contribuir para a suscetibilidade da doença quando associados a haplótipos com as variantes MHC. A sua variabilidade requer mais investigação científica, para que se correlacione, de forma definitiva, a sua função na suscetibilidade à doença (59)(88).

Foi evidenciado ainda que nos SNPs G/A, um na posição + 489 e noutro na posição -238, os heterozigotas apresentam um menor dano articular com o passar dos anos de doença por comparação aos indivíduos com o genótipo G/G, sendo portanto passível de considerar-se que a presença da variante confere um fator protetor e benéfico para os portadores (89,90).

Outro *locus* que parece ser importante na etiologia, é o gene TRAF1 (TNF receptor associated factor 1) na sub-região TRAF1-C. Este gene codifica uma proteína associada ao recetor do TNF importante para a transdução de sinal por ele desencadeada. A TRAF1 tem sido descrita como um inibidor de TNF e devido à evidência de altas concentrações destes mediadores inflamatórios, tenta-se comprovar o seu envolvimento na AR (91).

Foram descobertos dois polimorfismos importantes neste gene, o polimorfismo rs7021206 no intrão 3 e o rs3761847, que poderão estar implicados na suscetibilidade à doença não só ao nível genético, mas também ao nível racial. Num estudo, *Jing Zhu et al.* (92), comprovam não só um desequilíbrio de ligação entre ambos os polimorfismos, como também, uma variedade inter-racial. Neste estudo correlaciona-se positivamente as variantes polimórficas com um aumento do risco de desenvolver AR mas apenas para chineses e japoneses, e contrariamente, um risco diminuído de doença para caucasianos (92,93). Noutro estudo, *Tae-Un Han et al* (94), correlaciona apenas o polimorfismo rs7021206 com a AR tanto em coreanos como em caucasianos.

Um outro gene que merece destaque, é o gene PADI4, responsável pela expressão da isoenzima PADI4. Este gene pertence à família de genes PADI, onde cada gene pertencente codifica uma isoforma de enzima PADI, responsável pela reação de citrulinização dos resíduos de Arg das proteínas do organismo. É devido a tal mecanismo e à sua suposta importância na patologia que o estudo dos polimorfismos nesta família genética são de interesse (95).

O gene PADI4 fica localizado no cromossoma 1p36 do genoma humano sendo que a associação com os SNPs encontrados neste *locus*, foi primeiramente estudado em japoneses e mais tarde na população caucasiana, apesar de que nos caucasianos ainda não esteja bem estabelecida (96). De acordo com *Suzuki et al.* (97), quatro SNPs no gene PADI4 foram correlacionados com a AR na população japonesa e coreana. Estes SNPs são responsáveis pelas variantes: PADI4_89, no qual ocorre a permuta de uma Guanina

(G) por uma Adenina (A) no exão 2, PAID4_90 onde ocorre a permuta de uma T por uma C também no exão 2, PADI4_92, com permuta de uma T por uma C no exão 3 e por fim PADI4_104 com substituição de uma T por uma C no exão 4 (97). Neste mesmo artigo comprovou-se que portadores do haplótipo G-T-G-T apresentam um *odds ratio* (OR) de 1.97 por comparação com o grupo controlo. Apesar da confirmação da associação deste haplótipo na população japonesa, ainda é contestada a associação com a população caucasiana. Estudos com a população alemã, norte-americana, canadiana e francesa, demonstraram que existe uma associação dos haplótipos PADI4 com a incidência da AR, levando a um risco maior dos portadores das variantes de desenvolver a doença (97–99). Já para os espanhóis, ingleses, húngaros e para os egípcios, não foi encontrada evidência estatisticamente significativa para esta associação (100–102).

Esta variedade inter-racial no gene PADI4 poderá ser explicada pela componente ambiental, isto é, os fatores ambientais que os povos são sujeitos, e aliás, acredita-se que esta componente ambiental, também tenha um papel etiológico na doença (76).

Em 2007 foi ainda descrita a associação do gene STAT4 com a doença, embora com uma contribuição mais modesta do que os genes já descritos. Este gene é responsável pela produção e ativação do fator de transcrição 4 que tem um papel importante na sinalização de citocinas, como a IL-12, IL-23 e IL-27, necessárias para a ativação de linfócitos Th. Foi descoberto o SNP rs7574865, no qual ocorre uma substituição de uma G por uma T, comprovando-se que os portadores da variante apresentam um risco maior de doença que os homozigotas de referência (103–105).

2.5.2 Fatores ambientais

✓ Tabagismo

O principal fator ambiental que aumenta o risco das doenças reumáticas, tais como AR, é o tabagismo. Este fator foi definido como fator de risco para a AR no final dos anos oitenta e, tal como os fatores genéticos, pode manifestar a sua influência numa fase pré-clínica da doença (106).

Vários estudos têm vindo a demonstrar um aumento do risco de desenvolver AR com o tabagismo e com o genótipo dos alelos HLA-DRB1. Tal associação é independente da serologia do indivíduo, isto é, o tabagismo não está relacionado com a produção de anticorpos específicos da doença, quer ACPA quer FR. No entanto, a conjugação de hábitos tabágicos, os alelos HLA-DR β 1 e uma serologia positiva para ACPA ou FR, acresce o risco de doença (107–111), como se pode verificar nos gráficos 2.1 e 2.2, do estudo de *So Bang et al* (107).

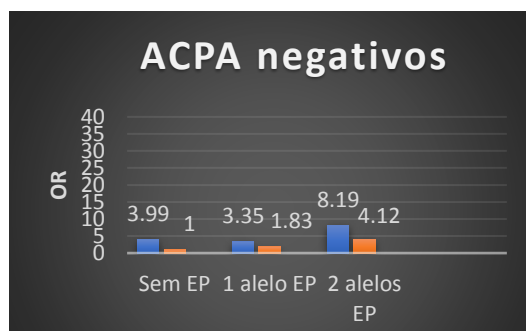


Gráfico 2.1-Odds ratio para a conjugação alelos HLA-EP, hábitos tabágicos e ACPA positivos (adaptado de *Bang* (107)).

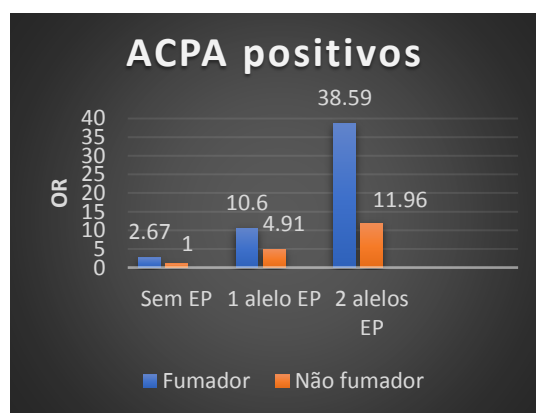


Gráfico 2.2-Odds ratio para a conjugação alelos HLA-EP, hábitos tabágicos e ACPA positivos (adaptado de *Bang* (107)).

Nestes gráficos é possível concluir que a associação é dependente da quantidade de alelos HLA, uma vez que, nos ACPA-positivos: os heterozigotas para as variantes (1 alelo EP) e fumadores apresentam um risco maior 10,60 vezes e os homozigotas para as variantes (2 alelos EP) e também eles fumadores apresentam um risco aumentado em 38,59 vezes, enquanto para indivíduos portadores do mesmo genótipo mas não-fumadores, o OR é 11,96. É igualmente possível verificar o fenótipo ACPA-negativos acarreta um risco moderado de desenvolver artrite enquanto que os ACPA-positivos apresentam um risco maior, isto tanto para fumadores como não-fumadores (107).

No estudo de *Källberg et al.*, foi possível correlacionar a intensidade dos hábitos tabágicos com o OR para a doença. Este grupo de trabalho conclui que quanto maior a intensidade do habito tabágico, aliado à presença de alelos HLA-EP, maior é o risco associado a este fator. Conclui também que para um fumador mediano (cerca de 10-19 maços de tabaco por ano), a cessação tabágica diminui o risco, de tal forma que, após 20 anos este risco torna-se equiparado ao risco de um individuo que nunca fumou (112).

✓ **Fatores hormonais**

Existe um risco maior de desenvolver a doença no género feminino do que no género masculino, sendo que, tal como já enunciado, há uma incidência maioritária na população feminina do que na população masculina. Julga-se que tal facto esteja associado à componente hormonal da mulher, mais concretamente às progesteronas e estrogénios, uma vez que estes componentes estão presentes no liquido sinovial em maior concentração do que androgénios, tanto em homens como em mulheres (113).

Pensa-se também que os androgénios terão um efeito anti-inflamatório, pelo que, não só protegem os homens de doenças inflamatórias autoimunes, como também ajudam a atingir um estado de remissão aquando portadores de AR (114).

✓ **Agentes infecciosos**

Têm sido relacionadas com o risco para a AR as infeções pelos vírus *Epstein-Barr* e citomegalovirus, e por bactérias, como a *Escherichia coli* (37,115). Um dos agentes infecciosos mais relacionados é a *Porphyromonas gengivalis*, uma bactéria anaeróbia que desencadeia uma doença periodontal crónica. Esta bactéria apresenta uma forma de PADI4 que se pensava ser capaz de citrulinar proteínas do hospedeiro e assim ativar o sistema imunitário do mesmo, aumentando o risco de desenvolver AR. Mas este mecanismo foi revogado no estudo de *Konig. et al*, comprovando que a PAD da bactéria não citrulina as proteínas humanas, não levando a um aumento dos ACPA (116). Assim ainda se procura conhecer de que forma esta bactéria aumenta a suscetibilidade da AR.

✓ **Microbiota gastrointestinal**

Recentemente tem-se vindo a reconhecer a influência da microbiota gastrointestinal no desenvolvimento da AR, ainda que não se conheça totalmente o mecanismo patológico envolvido nesta associação (117).

2.6 Patologia

A AR resulta da interação entre os fatores genéticos e fatores ambientais, levando a uma auto-reatividade com progressiva destruição articular. E embora seja uma doença amplamente estudada e definida, os mecanismos fisiopatológicos que levam ao seu desenvolvimento permanecem pouco esclarecidos (118). A patologia pode ser dividida em três fases (ver figura 2.13).

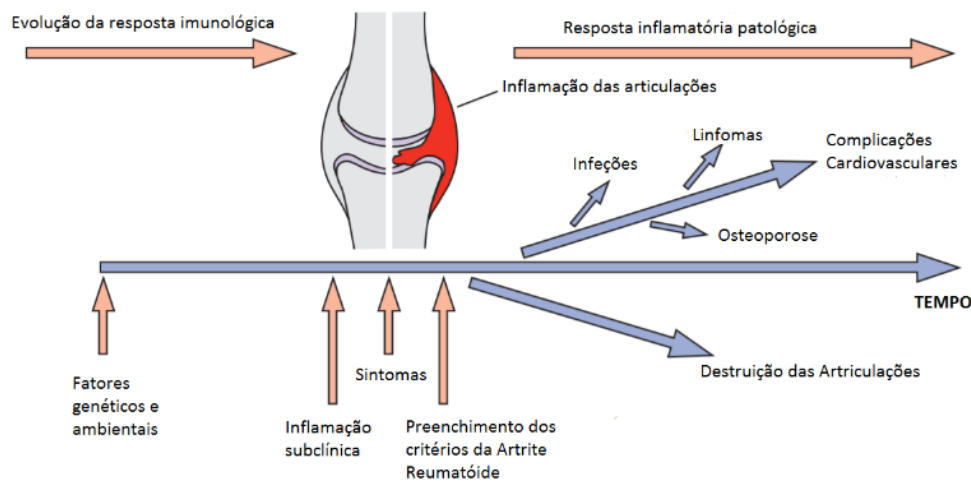


Figura 2.13-Evolução natural da doença, composta por 3 fases: A fase pré-articular, fase de transição (inflamação subclínica) e a fase articular (adaptado de *Klareskog* (3)).

Primeiramente, uma fase sem sintomatologia clínica, designada fase pré-articular ou fase linfóide, onde ocorre grande atividade imunitária. Seguida por uma fase de transição já com uma inflamação subclínica presente, e por fim, a fase articular responsável pela sintomatologia de inflamação, erosão articular e MEA, próprias da doença (119)(3).

Os mecanismos fisiopatológicos da doença ainda estão pouco esclarecidos, mas acredita-se serem instigados tanto pelo sistema imunitário adaptativo bem como o sistema imunitário inato.

2.6.1 Fase pré-articular

A fase pré-articular prende-se com as alterações genéticas e fatores ambientais enunciados anteriormente. A enzima PAD leva à citrulinização de péptidos do organismo, tornando-os “*non-self*”. Estes péptidos citrulinados são reconhecidos pelas APC (células dendríticas ou macrófagos) e ligam-se às moléculas de MHC, ocorre uma interação MHC-TRC. Desta ligação ocorre a diferenciação em linfócitos CD4+ (thelper) e linfócitos CD8+ (citotóxicos)(3).

Os linfócitos Th adquirem o seu fenótipo pelas citocinas que lhe dão origem. Através da análise do líquido sinovial dos doentes de AR encontrou-se grandes concentrações de IL-17, originando um subtipo de Th1, os linfócitos Th17 (120). Estes linfócitos têm vindo a ser apontados como potenciais promotores da doença desde que foram descobertos em 2005, uma vez que induzem a libertação de mediadores pós-inflamatórios como as IL-17, IL-6, IL-22 e TNF- α . Devido a esta sinalização quimiotática, ocorre uma afluência de macrófagos e fibroblastos, potenciando ainda mais o início da inflamação (121). Após a sua diferenciação, os linfócitos Th17 auxiliam na ativação dos linfócitos B, originando assim plasmócitos (linfócitos B efetores) que produzem AC's para os CCP(3).

Ocorre assim, a formação de folículos linfóides. Estes folículos encontram-se ricos em agregados de linfócitosTh17-linfócitosB e expressam fatores de proliferação induzida por ligação (APRIL, do inglês *proliferation-inducing ligand*), estimuladores de linfócitos B (BlyS, do inglês *B-lymphocyte stimulator*) (122,123). Começa a ocorrer uma acumulação de plasmócitos e de ACPA, que são libertados no organismo. Uma vez fora dos órgãos linfóides secundários, os plasmócitos entram no tecido sinovial, começando assim a fase de inflamação subclínica da doença.

2.6.2 Fase de inflamação subclínica

A sinovite é caracterizada pela acumulação de inúmeras células imunológicas que atuam em sinergia com citocinas provocando assim a inflamação do tecido.

Nesta fase subclínica, ainda não são sentidos grandes efeitos erosivos nas articulações. Ocorre um aporte de plasmócitos que reagem contra os CCP presentes localmente. São também libertados Th17, que estão também associados à destruição das articulações, pois promovem a ativação de osteoblastos, osteoclastos e sinoviócitos

fibroblastos sinoviais) que libertam metaloproteinases (MMP) e moléculas de ligando recetor ativador do fator nuclear- kappa B (RANKL) (ver figura 2.14) (124,125).

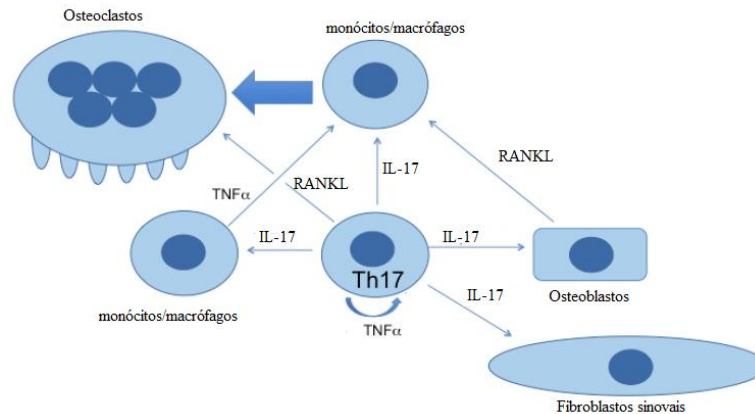


Figura 2.14-Esquema do possível mecanismo de patogénese na AR, instigado pelos Th17 (adaptado de Kotake (124)).

Outras células T com importância na AR, são os linfócitos T reguladores (Treg). Este tipo de linfócitos tem como função suprimir a diferenciação de linfócitos T autorreativos através da libertação de IL-23, mantendo a homeostase do SI (sistema imunitário). Na AR existe um desequilíbrio deste mecanismo de controlo, pois o “cocktail” de mediadores inflamatórios suprimem a diferenciação de Treg e aumentam a diferenciação de Th17, levando à autorreatividade própria da doença (37).

O sistema imunitário inato também tem grande contributo nesta doença. Após a entrada dos plasmócitos no tecido sinovial, ocorre uma ativação de macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, e mastócitos (122). Não obstante, parecem ser os macrófagos que desempenham um papel de maior interesse na inflamação sinovial pois são encontrados em grandes concentrações no líquido sinovial dos doentes (126). Estas células libertam citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23 provocando uma cascata inflamatória massiva. Devido à abundância de macrófagos no tecido sinovial e à grande libertação de IL, acredita-se que, é da responsabilidade destas células a diferenciação dos linfócitos T *naive* sinoviais em linfócitos Th1, Th17 e Treg. E a regulação da efetividade das Treg, uma vez que as moléculas de TNF- α têm a

capacidade de baixar a expressão da sua FOXP3 (ver figura 2.15) (120,126,127). É de salientar que esta diferenciação em th17, pode dar-se pela ligação das citocinas libertadas com o recetor de citocinas ou por contacto com péptido MHC transportados por células ACP (119).

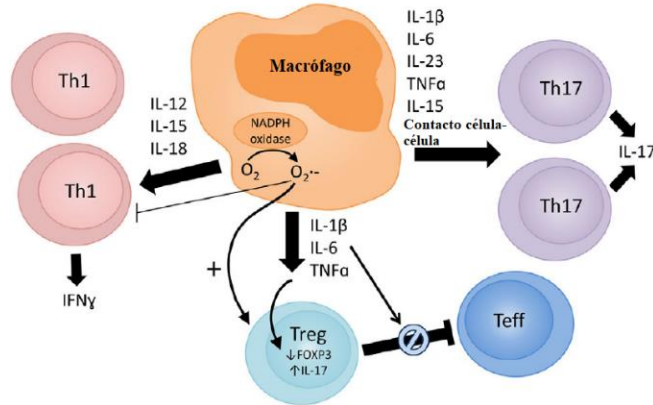


Figura 2.15-Mecanismo mais provável do papel dos macrófagos na modulação das células CD4+ (adaptado de Roberts (126)).

Começa-se a fazer sentir a cronicidade da doença, uma vez que, com a libertação de Th17 ocorre um aporte de macrófagos indiferenciados vindo da medula óssea para o tecido sinovial, provocado pelo estímulo pelas citocinas IL-17, IL-6, IL-22 e TNF- α . Uma vez chegados ao tecido articular são diferenciados e atuam na diferenciação de Th *naives* em th17, ocorrendo assim um ciclo vicioso levando à patogenia e cronicidade da doença.

2.6.3 Fase articular

A fase articular já é sentida pelo doente, é a fase onde aparecem os sintomas da doença e onde começa a destruição progressiva da articulação.

Ao longo do tempo, o conjunto de células imunitárias e citocinas inflamatórias presentes no tecido sinovial forma um pannus, um tecido de origem inflamatória que inunda a articulação e que proporciona um microambiente propício à continuidade da inflamação e começo da destruição de cartilagem e osso (28). A destruição da cartilagem e do osso sinovial são resultantes de mecanismos fisiopatológicos distintos, no entanto, ambos dependem da inflamação presente na articulação (3).

✓ Destruição da cartilagem sinovial

No tecido sinovial estão presentes dois tipos de sinoviócitos, os macrófagos sinoviais ou sinoviócitos tipo A e os fibroblastos sinoviais ou sinoviócitos tipo B, sendo que são os fibroblastos sinoviais as células que têm função de manter a estrutura articular saudável e produzir os componentes do líquido sinovial. Na AR o *pannus* agrega-se à membrana sinovial e preenche toda a cavidade articular, levando à hipertrofia da mesma. Este *pannus* é rico em células inflamatórias mas são os fibroblastos sinoviais as células que estão presentes em maior número (ver figura 2.16) (128).

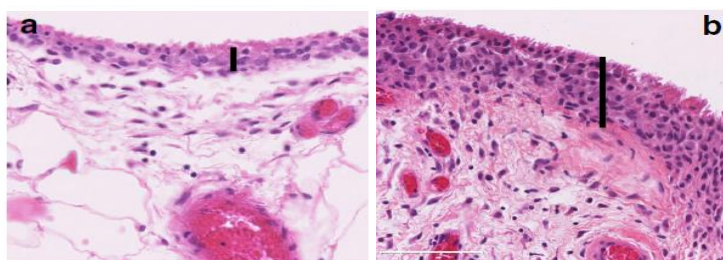


Figura 2.16-Amostras de tecido sinovial de humano. **A-** Tecido e membrana sinovial saudáveis. **B-** Tecido de um doente de AR, com uma hipertrofia da membrana sinovial (adaptado de *Bustamante* (128)).

A destruição da cartilagem começa aquando a perda dos elementos protetores da articulação, como é o caso da lubricina, um proteoglicano que faz parte do líquido sinovial e protege a articulação lubrificando-a (129). Os fibroblastos sinoviais são ativados por libertação de estímulos associados ao risco (DAMPs), como abertura dos canais de cálcio, citrulinização proteica, Ac's ou citocinas inflamatórias, e começam a invadir a cartilagem sinovial (37,128). Os fibroblastos sinoviais após ativados sintetizam MMP, particularmente MMP-1,3,8,13,14 e 16. Estas MMP têm a capacidade de degradar a matriz rica em colagénio tipo I do osso e colagénio tipo II da articulação, e, apesar de ainda não se conhecer o seu mecanismo, são apontadas como o principal fator de destruição articular na AR (130).

Outro mecanismo fisiopatológico apontado para a destruição da cartilagem é promovido pelos condrócitos, uma vez que a destruição da matriz cartilaginosa numa AR inicial ocorre igualmente nas zonas mais profundas da cartilagem e não apenas, junto ao *pannus*. Em condições normais os condrócitos participam na homeostasia da cartilagem,

produzindo colagénio e preservando a retenção de proteoglicanos. Na AR estes condrócitos, sob a influência de IL-1, IL-17, TNF- α e de espécies NO, alteram a sua atividade promovendo o catabolismo desta matriz. Assim há uma libertação de MMP e de ADAMT's (desintegrina-metaloproteases com um domínio idêntico à trombospondina) pelos condrócitos, que resulta numa degradação do proteoglicano agrecan, essencial na integridade da matriz (ver figura 2.17) (119,131).

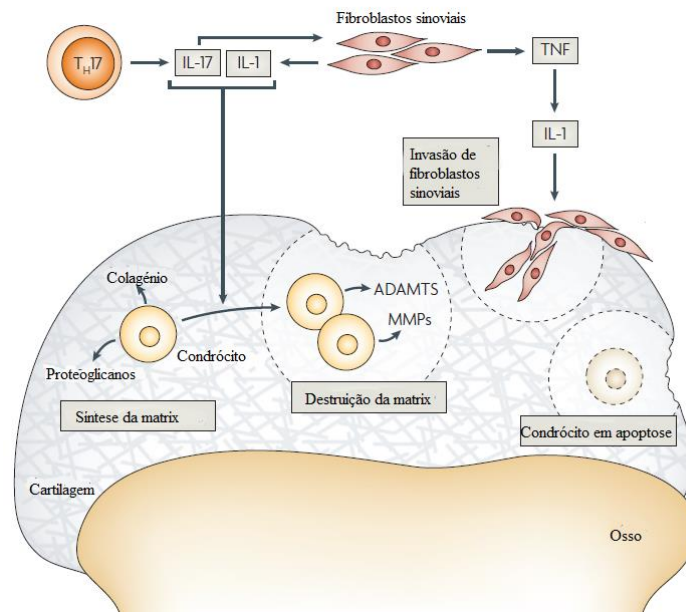


Figura 2.17-Esquema do mecanismo de regulação da matriz cartilaginosa pelos condrócitos e desregulação deste mecanismo por citocinas que resulta na degradação da matriz (adaptado de *McInnes* (119)).

✓ Destruição óssea sinovial

As células que medeiam a reabsorção de material ósseo são os osteoclastos. Estas células são multinucleares e derivam da linhagem mielóide dos monócitos/macrófagos. A reabsorção do osso ocorre pela libertação, pelos osteoclastos, de enzima proteolíticas como as MMP que descalcificam os componentes inorgânicos e degradam a matriz óssea (132). A homeostasia do sistema ósseo é perdida na AR, uma vez que, o equilíbrio entre os osteoclastos e os osteoblastos foi perdida, levando assim à destruição das articulações (133).

No *pannus*, ocorre a diferenciação, a partir dos monócitos, e maturação dos osteoclastos. Estes processos ficam a cargo de várias citocinas sinoviais como, o fator de

estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) e RANKL (133), uma vez formados os osteoclastos maduros migram até ao osso (119).

O RANKL é uma proteína transmembranar que na AR é produzida pelos linfócitos Th17 no tecido sinovial. Invocando de novo a figura 2.14, revê-se que a IL-17 tem um grande papel na estimulação da produção de RANKL, pois aumenta diretamente a sua produção pelos fibroblastos e macrófagos sinoviais que, produzem eles próprios RANKL e indiretamente pela produção de TNF- α , um estimulador potente da produção deste fator (133,134). Para que ocorra maturação dos osteoclastos a proteína RANKL têm de se ligar ao seu recetor, o RANK. Esta ligação pode ser antagonizada pela osteoprotegerina (OPC), uma vez que, esta proteína apresenta uma afinidade para o recetor RANK. Assim é presumível que, o balanço entre os níveis de RANKL e OPC sejam importantes para a osteoclastogénese (134).

Com a sinergia entre as citocinas e o nível diminuído de OPC, ocorre a maturação dos osteoclastos e uma libertação de MMP que começam a degradar tecido ósseo, provocando as lesões radiológicas típicas da doença (ver figura 2.18)

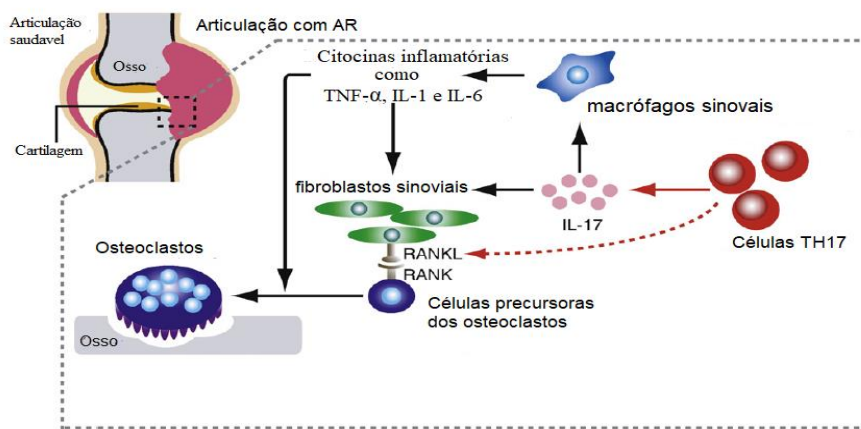


Figura 2.18-Esquema da regulação da diferenciação de osteoclastos na AR (adaptado de *Okamoto* (132)).

Apesar de ocorrerem por diferentes vias, a deterioração da cartilagem e do osso resultam numa sinergia de edema, dor e desgaste radiográfico. Sendo crucial um estudo persistente dos mecanismos fisiológicos para que se aperfeiçoe a terapêutica já existente e se crie alternativas novas para travar a doença.

3 Terapêutica farmacológica

Os objetivos terapêuticos devem ser explicados aos doentes e devem visar a redução da dor e da inflamação, retardar ou impedir a progressão da destruição das articulações, manter a funcionalidade ao nível pessoal e laboral, melhorar a qualidade de vida, e principalmente, alcançar um estado de remissão da doença (25). A remissão da doença significa que se diminuiu a atividade da doença praticamente a um nível residual, e é definida pela ausência de sintomas de rigidez matinal, dor, fadiga, de sinovite, de progressão radiográfica da lesão e baixos níveis de PCR (135).

As opções terapêuticas para o tratamento da AR incluem principalmente quatro classes farmacológicas:

- Analgésicos e anti-inflamatórios não esteróides (AINEs);
- Corticóides, nomeadamente, glucocorticoides;
- Modificadores da doença reumática (DMARDs, do inglês *disease modifying antirheumatic drugs*) convencionais;
- DMARDs biológicos.

3.1 Analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides

A cascata do ácido araquidónico é uma via de síntese de mediadores de inflamação importante no organismo (38). Nesta cascata atuam duas vias de síntese distintas, a via da ciclooxigenase (COX) e a via da lipoxigenase (LOX). Sendo que é a via da COX a responsável pela formação de prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TB) e de prostaciclina, os metabolitos pró-inflamatórios, sendo a via de maior interesse na AR (136).

A COX possui duas isoformas, a ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2), que são expressas no organismo de forma diferente. A COX-1 é expressa em múltiplos tecidos, sendo crucial nos processos hemostáticos, como a proteção contra lesões gástricas provocadas pelo ácido produzido pelas células gástricas. Por contrapartida, a COX-2 é expressa em situações de patologia através da participação de citocinas pró-inflamatórias, facilitando a resposta inflamatória em órgãos mais particulares, de que é exemplo o pulmão numa situação de asma (136,137).

Os AINEs são fármacos que atuam na inflamação através da inibição seletiva ou não-seletiva das isoformas enzimáticas, evitando a produção de PGs e reduzindo a inflamação. Estes fármacos são utilizados na AR pois atenuam os sintomas, mas não são considerados modificadores da doença. Apresentam também funções analgésicas e antipiréticas mas são as propriedades anti-inflamatórias as funções mais marcantes na doença (136).

São classificados consoante a sua estrutura química e a sua seletividade, isto é, se inibem apenas uma forma enzimática, normalmente a COX-2, são designados inibidores das COX-2 ou coxibes; ou se inibem tanto a COX-1 como a COX-2, são designados como AINEs não-seletivos ou tradicionais (Quadro 3.1) (136,138).

Quadro 3.1-Classificação de AINEs (adaptado de *Crofford* (138))

Classe	Subclasse	Fármaco
Ácidos carboxílicos	Ácido salicílico	- Ácido acetilsalicílico (Aspirina [®] ; AAS150 [®])
	Ácidos acéticos	- Diclofenac (Voltaren [®] ; Arthrotec [®] ; Catafalm [®]) - Etodolac (Sodolac [®]) - Indometacina (indocid [®]) - Cetorolac (toradol [®])
	Ácidos propiónicos	Flurbiprofeno (Ansaid [®]) - Cetoprofeno - Oxaprozin - Ibuprofeno (Brufen [®]) - Naproxeno (Naprosyn [®] ; Vimovo [®]) - Dexcetoprofeno (Skudexa [®] ; Kettesse [®])
Ácidos enólicos	Pirozolonas	- Fenilbutasona
	Oxicans	- Piroxicam (Feldene [®]) - Meloxicam
Não-acídicos		- Nabumetasona (Relafen [®])
Inibidores das COX-2	Sulfonamidas	- Celecoxib (Celebrex [®])
	Sulfonilureias	- Etericoxib (Arcoxia [®] ; Exxiv [®] ; Turox [®])

Tanto os coxibes como os AINEs não-seletivos estão indicados no alívio da inflamação, tendo uma eficácia terapêutica semelhante já comprovada por vários ensaios

clínicos (139–141). Segundo *Emery P. et al*, é possível comparar a tendência da dor e do edema articular ao longo das semanas de tratamento com estes fármacos. Observa-se que para um inibidor seletivo da COX-2 (neste caso o celecoxib) e para um AINE não-seletivo (o diclofenac), o efeito terapêutico é semelhante tanto na diminuição do edema articular como no alívio da dor, sendo que para tal, os pacientes têm de se submeter a um tratamento prolongado (ver figuras 3.1) (142).

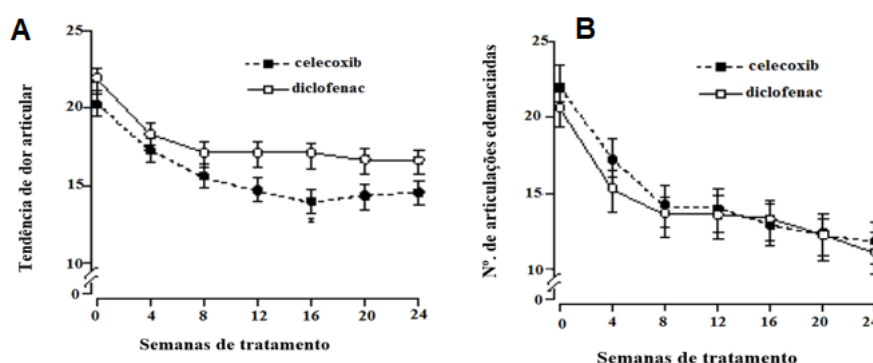


Figura 3.1-A-Comparação do efeito anti-inflamatório da terapêutica prologada com AINEs não seletivos e inibidores da COX-2 na dor articular; B-Comparação do efeito anti-inflamatório da terapêutica prologada com AINEs e inibidores da COX-2 no número de articulações com edema (a adaptado de *Emery* (142)).

Com uma eficácia semelhante é nos efeitos adversos que a ponderação por parte do clínico reverte, principalmente quando são tomas de forma crónica, como no caso destes doentes. Assim é de relevância extrema um “olhar” sobre os seus efeitos adversos a longo prazo.

Devido às diversas funções das PGs e dos TB, o uso crónico de AINEs potencia a recorrência de efeitos adversos (ver quadro 3.2). Um dos efeitos mais preponderante na escolha destes fármacos é a incidência de úlceras gástricas na população. Tal como já referido, as PGs sintetizadas pela COX-1 protegem a mucosa do pH ácido do suco gástrico e como tal, uma inibição das COX-1 irá provocar um decréscimo destes protetores gástricos naturais provocando uma lesão interna na parede gástrica que pode ter complicações graves se não for tomadas medidas (143). Como os inibidores das COX-2 não inibem as PGs gástricas, estas úlceras gástricas são mais incidentes em doentes que tomam os AINEs não seletivos do que os coxibes (142,144–146).

Outro sistema orgânico que é afetado com seriedade pelo uso abusivo destes fármacos é o sistema cardiovascular. Vários estudos correlacionam o aumento do risco de eventos cardiovasculares (CDV), tais como aumento da pressão arterial (PA), arritmias, e enfarte agudo do miocárdio, não só com a toma de AINEs não-seletivos, mas principalmente com os inibidores das COX-2. Como os doentes de AR tem um risco acrescido destas complicações é de importância uma ponderação aquando da prescrição desta classe farmacológica (143,147–149).

Quadro 3.2-Efeitos adversos associados à toma de AINEs (adaptado de Varga (143))

Sistema gastrointestinal	Esofagites e úlceras gástricas, náuseas, vômitos, enfartamento, diarreia, obstipação.
Sistema renal	Taxa de filtração glomerular diminuída, retenção de sódio e água, edema, hipercaliemia, insuficiência renal.
Sistema cardiovascular	Eventos tromboembólicos, HTA, insuficiência cardíaca congestiva, arritmias, enfarte agudo do miocárdio.
Sistema nervoso central	Dor de cabeça, fadiga, insónia, vertigens.
outros	Exacerbação dos ataques de asma, urticária, neutropenia.

Com a incidência de comorbilidades relacionadas com esta toxicidade a longo prazo, é bastante típica a prescrição de outros medicamentos, par além dos já utilizados para a doença. São exemplo, os inibidores das bombas de protão (PPI), antiácidos, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), β - bloqueadores entre outros.

3.2 Glucocorticoides

Como os AINEs os corticoides são utilizados na AR já há algum tempo, tendo sendo mesmo insinuados como cura para a doença (150). São utilizados eficazmente na redução da sintomatologia tanto da AR, sendo utilizados por cerca de 90% dos doentes ao redor do mundo, mas também atua noutras patologias reumáticas e não-reumáticas (151). No entanto, e apesar de uma eficácia terapêutica comprovada, os glucocorticoides têm um incidência de efeitos adversos frequentes, levando a um debate inerente do benefício-risco do uso desta terapêutica cronicamente (152)(153).

Os glucocorticoides apresentam dois mecanismos de ação terapêutica distintos, são anti-inflamatórios e imunossupressores. Estes fármacos atuam mimetizando as hormonas supra-renais naturais do organismo, como o cortisol (136). As moléculas de

glucocorticoides atravessam a membrana celular e ligam-se ao recetor de glucocorticoides no citoplasma da célula, esta ligação forma um complexo capaz de irromper até ao núcleo. Uma vez no núcleo este complexo liga-se ao promotor dos genes responsáveis por vários fatores de crescimento, citocinas e mediadores pró-inflamatórios (154).

Para o efeito anti-inflamatório, ocorre uma ativação de genes levando a uma extensa transcrição dos mRNA e produção de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina I, que inibe a fosfolipase A₂ parando assim a cascata do ácido araquidónico e o papel das COX's (155), este processo tem o nome de transativação (151). Por contrapartida, o seu efeito imunossupressor ocorre com a inibição dos genes que são responsáveis pela produção de proteínas responsáveis pela diferenciação e proliferação de linfócitos T e B, pela libertação e estimulação de citocinas como a IL-2, levando a uma diminuição da produção de anticorpos e consequentemente baixando a componente autoimune da AR. Esta inibição tem o nome de transrepressão e ocorre bloqueando a ligação, através do complexo glucocorticoide com o seu recetor, do fator de transcrição NF- κ B, e por consequência não ocorre formação do mRNA codificador das proteínas pró-inflamação. (ver figura 3.2) (27,136,154,156).

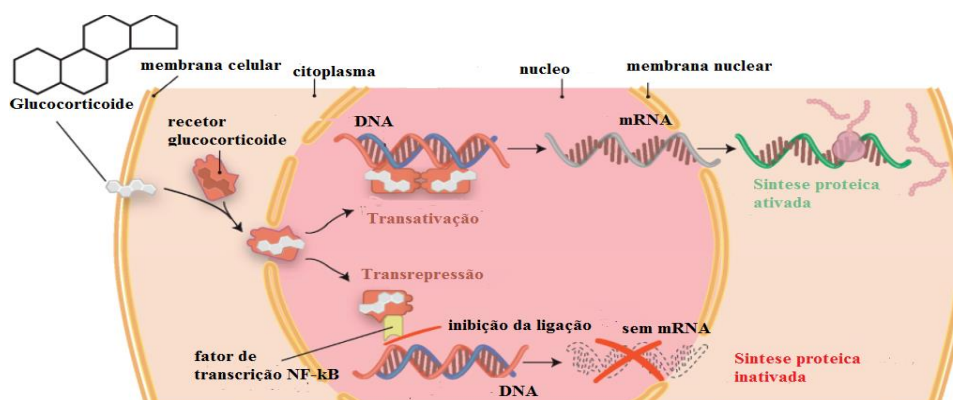


Figura 3.2-Esquema dos mecanismos anti-inflamatório e imunossupressor dos glucocorticoides, através da modelação de genes (adaptado de *Van der Goes* (151)).

Os mecanismos de ação já descritos são passíveis de acontecer com uma terapêutica com doses baixas e contínuas. Como os fármacos atuam ao nível da transcrição de genes, apresentam um efeito terapêutico a curto e médio prazo (157,158). Esta terapia é altamente eficaz no alívio da rigidez muscular matinal e na progressão da erosão articular, tanto em monoterapia, como em associação com DMARDs (151,159–163).

3.3 Modificadores da doença reumática

O “tratamento”, propriamente dito, da AR é essencialmente assente na prescrição de fármacos com capacidade de modificar o curso natural da doença, os DMARDs. Estes fármacos são caracterizados pela sua capacidade de reduzir e reverter os sinais e sintomas próprios da doença. Com mecanismos farmacológicos diversos, impedem a progressão do dano articular, diminuem a morbidade e aumentam a capacidade laboral do doente, aumentando, por consequente, a sua qualidade de vida (164).

São divididos em duas grandes classes farmacológicas: 1- compostos químicos sintéticos, ditos DMARDs tradicionais (tDMARDs); 2- compostos biológicos, ditos DMARDs biológicos (bDMARDs), vulgarmente chamados “biológicos” (164).

A sua utilização como terapêutica preferencial na doença, visa como já referido anteriormente, a remissão da doença. Para tal, é recomendado, pelo ACR e pela EULAR, a prescrição destes fármacos por um reumatologista especialista em AR, de forma precoce após o diagnóstico. Um tratamento adaptado a cada doente, com um controlo de eficácia/toxicidade pelo menos, uma vez por ano, sendo que no início da terapêutica dever-se-á proceder ao controlo após 3 meses do começo da administração (40,164).

3.3.1 DMARDs tradicionais

3.3.1.1 Metotrexato

O MTX é classificado como antagonista dos folatos devido à sua estrutura análoga a estes compostos, este fármaco tem propriedades anti-proliferativas, imunossupressoras e anti-inflamatórias. É de salientar que não estão bem esclarecidos os mecanismos de ação na AR (165,166). Tem sido investigado *in vitro* o efeito na atividade dos linfócitos T, onde uma dose baixa de MTX leva a uma redução da proliferação destas células e a uma estimulação da apoptose (167).

Já foi correntemente utilizado como terapêutica antineoplásica, mas presentemente é recomendada a sua utilização como primeira linha na AR suprimindo o dano articular e atrasando a sua progressão (164,168). Pode ser administrado por via oral ou por via subcutânea (SC), na qual foi comprovado ter uma eficácia superior em diversos estudos, utilizando a mesma dose (169–171). Pode ser utilizado em monoterapia e em terapia combinada com outros tDMARDs. A terapia combinada é uma opção terapêutica quando o doente não responde positivamente ao MTX sozinho, tendo por vezes, uma eficácia terapêutica superior à monoterapia (172,173).

Mecanismo de ação

As moléculas de MTX entram no meio celular por transporte ativo através do transportador de folatos, o transportador de influxo SLC19A1 ou RFC (174). Uma vez dentro da célula sofre uma reação de poliglutaminação pelo enzima folilpoliglutamato sintase (FPGS), formando moléculas de MTX com resíduos de glutamato, designadas por MTX-pg. Esta reação de glutaminação é reversível através da atividade do enzima γ -glutamil hidrolase (GGH). Comparados com o MTX, os metabolitos ativos MTX-pg têm uma atividade ampliada essencial para um efeito terapêutico mais pronunciado e apresentam concentrações intracelulares mais elevadas. Acredita-se que estes metabolitos reduzem o efluxo das células pelos transportadores ABC, nomeadamente os transportadores ABCB1 e ABCC1-4 (12,136,165), evitando assim processos de resistência.

O MTX-pg tem o seu efeito dependente da função de diversas enzimas na via dos folatos para além da DHFR, tais como a metilenotetrahidrofolato desidrogenase (MTHFD1), da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e da timidilato sintase (TYMS). Após a formação de MTX-pg ocorre uma inibição competitiva do enzima dihidrofolato redutase (DHFR) impedindo a conversão de moléculas de dihidrofolato (DHF) em moléculas de tetrahidrofolato (THF), impedindo assim a via dos folatos(175).

O MTX-pg atua também na TYMS, enzima responsável pela produção de moléculas de DHF que são usadas pela DHFR, e conversora de desoxiuridilato (dUMP) em desoxitimidilato (dTMP), conversão esta, que é essencial para a biossíntese de bases pirimídicas (176).

A MTHFR não é diretamente inibida pelo MTX-pg, a sua importância depende-se na conversão de 5,10-metil-THF em 5-metil-THF, co-fatores para o processo de síntese de poliaminas, descrito de seguida. Estas enzimas apresentam um sinergismo, atuando em conjunto na via dos folatos, levando à formação de purinas e pirimidinas e por fim à síntese e reparação de moléculas de DNA. É desta inibição da replicação e da proliferação celular, através da inibição de ácidos nucleicos que advém o interesse deste fármaco na AR (165,166,177).

As moléculas de THF e a sua forma metilada (5-metil-THF) são igualmente importantes na formação de poliaminas tóxicas, uma vez que doam grupos metilo para a produção de homocisteína, de metionina e S-adenosilmetionina (SAM) e, finalmente,

poliaminas. Uma vez formadas estas poliaminas são convertidas em amónia e peróxido de hidrogénio pelos monócitos, levando à inflamação e à dor (178). Estas poliaminas foram encontradas acumuladas no sangue periférico, tecido sinovial e na urina destes doentes, podendo contribuir para os sintomas da doença. Devido à inibição da produção de THF pelo MTX-pg é possível o controlo da formação de poliaminas e assim um efeito anti-inflamatório (179,180).

Outro potencial efeito anti-inflamatório do MTX é a inibição da degradação da adenosina, um nucleótido purínico com efeitos anti-inflamatórios e vasodilatadores. Este nucleótido é degradado pela adenosina desaminase (ADA) a inosina, tendo um tempo de semi-vida curto. O MTX inibe a atividade da ribonucleotido 5-aminoimidazol-4-carboxamida transformilase (ATIC) que é responsável pela conversão de ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) em formil-AICAR (FAICAR). A AICAR inibe a ação enzimática da ADA sobre a adenosina, levando a um aumento do tempo de semi-vida desta purina na célula. Portanto, se a ATIC é inibida, é normal que ocorra um aumento de AICAR no meio celular e por consequência um aumento da concentração extracelular de adenosinas, e um efeito anti-inflamatório. É esta acumulação de adenosinas que se pensa levar a um efeito anti-inflamatório por via do MTX-pg (12,181,182).

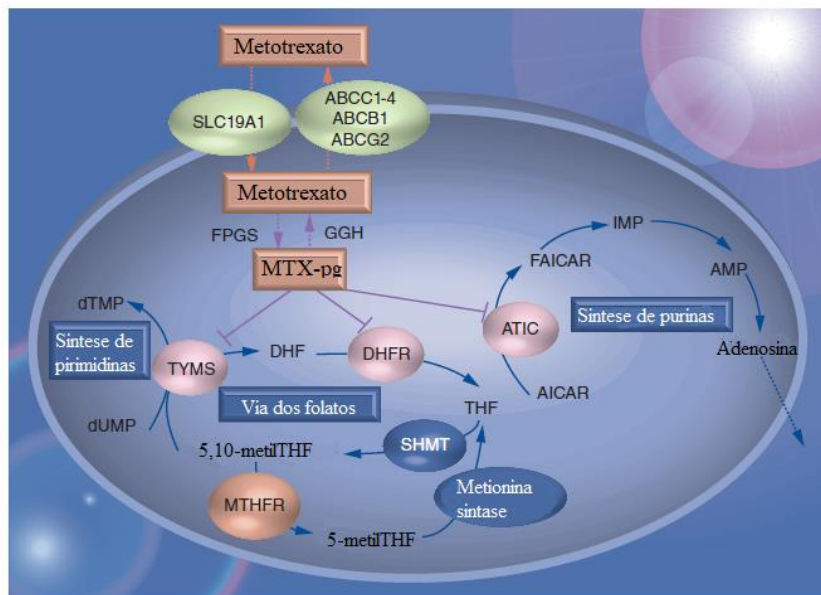


Figura 3.3-Esquema dos vários mecanismos de ação do metotrexato (adaptado de Zhu (176))

Segurança e efeitos adversos

Apesar de bem tolerado pelos doentes existem alguns efeitos adversos relacionados à sua administração. Estão associados com frequência a baixas doses de MTX efeitos como a dor de cabeça, falta de concentração, vômitos e náuseas, diarreia, úlceras no trato gastrointestinal, alopecia, anemia, neutropenia e linfopenia. Estes efeitos são considerados poucos preocupantes e são o resultado da ação anti-proliferativa do fármaco, sendo portanto recomendada uma monitorização periódica do estado de saúde do doente (136,183).

Efeitos adversos mais severos também podem estar associados com o MTX, nomeadamente, cirrose e fibrose hepática e a incidência de infeções oportunistas derivadas de um SI (sistema imunitário) comprometido (183).

Para a atenuação dos efeitos adversos hepáticos e gastrointestinais é recomendado aos doentes que procedam a uma suplementação com ácido fólico, para que estas moléculas compitam com o MTX pelo centro ativo das enzimas da via dos folatos, mais concretamente pelo centro ativo da DHFR. Com esta suplementação, ocorre uma atenuação destes efeitos e uma maior comodidade para os doentes (184–186).

3.3.1.2 Leflunomida

A leflunomida (LEF) é um pró-fármaco, e como tal, após uma metabolização pelo citocromo P450 (CYP)1A2 converte-se no seu metabolito ativo, o A771726 (187).

Tem vindo a ser utilizado de forma a travar o dano articular e proporcionar alívio dos sintomas e sinais da doença. Apresenta um início de ação terapêutica de quatro semanas e é classificado como tDMARDs (188). A sua atuação na AR tem sido investigada com o objetivo de inferir sobre a sua eficácia numa fase inicial da doença, tendo sido comprovada a regressão do dano articular e a diminuição do número de articulações envolvidas, e como tal, uma diminuição da atividade da doença levando em alguns casos à remissão (188–191).

No seu estudo prospetivo, Kellner *et al.*(192) reúne 270 pacientes adequados para as condições em estudo e administra-lhes 100 mg de LEF/dia (dose de carga recomendada). Posteriormente administram a 91.6% destes pacientes uma dose de manutenção de 20mg de LEF/dia e a 8.4% 10 mg de LEF/dia. As conclusões das

observações retiradas durante $25,5 \pm 6,0$ semanas de estudo encontram-se na tabela 3.1 (192).

Tabela 3.1- Melhorias dos parâmetros da atividade da doença ao longo do estudo (efetividade na população) (adaptado de *Kellner* (192)).

	Início do estudo	Após 12 semanas de tratamento	Após 24 semanas de tratamento	P value dos resultados
Envolvimento articular global DAS28	10,1 \pm 6,6	5,7 \pm 5,4	3,9 \pm 4,7	<0,001
Nº de articulações edemaciadas (n)	8,1 \pm 5,7	9,1 \pm 4,2	2,6 \pm 3,6	<0,001
Taxa de sedimentação eritrocitária (mm/h)	39,7 \pm 22,4	26,1 \pm 19,4	23,2 \pm 17,2	<0,001
PCR (mg/L)	37,7 \pm 80,5	Não foi medida	13,2 \pm 22,4	<0,001

Dos dados da tabela 3.1 é passível concluir uma melhoria ao longo das semanas de tratamento, uma vez que ocorreu um decréscimo dos parâmetros utilizados para o calculo do índice DAS28, isto é um menor número de articulações tumefactas, menor taxa de VGS e uma PCR mais baixa, resultando numa diminuição da atividade global da doença. Assim pode-se concluir que a LEF é de facto uma opção terapêutica com eficácia na AR.

Foi ainda possível concluir acerca da atividade da doença nos vários pacientes ao longo do tratamento. No início do estudo foram calculadas as atividades da doença para cada paciente, sendo que neste período, 71% dos pacientes tinham uma atividade da doença alta, 24,1% dos pacientes uma atividade moderada, 3,1% tinham uma atividade baixa e apenas 1,7% dos pacientes estavam em remissão clínica. Ao longo do tempo do tratamento é possível ver melhorias nestes resultados, tanto que, no final do estudo (passadas 24 semanas) a percentagem de pacientes com atividade alta reduziu para 13,8%, evidentemente que tanto a percentagem atividade baixa e moderada como a percentagem de remissão clínica aumentaram (ver gráfico 3.1)(192).

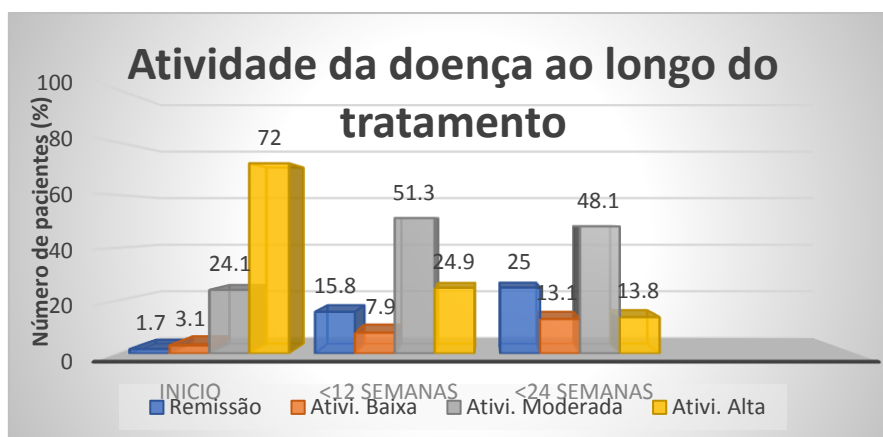


Gráfico 3.1-Evolução da atividade da doença (pelo DAS28 score) durante as semanas de tratamento dos pacientes com LEF (adaptado de *Kellner* (192)).

Estas melhorias são demonstradas com o uso de LEF num curto-médio espaço de tempo por comparação a placebos, sendo possível concluir que esta terapêutica poderá ser uma mais valia no combate da AR inicial por si só, mas também, em combinação terapêutica com o MTX (193).

Mecanismo de ação

Pensa-se existirem dois mecanismos de ação que levam à eficácia terapêutica deste fármaco: uma inibição do enzima dihidroorotato desidrogenase (DHODH) e uma inibição da tirosina cinase.

✓ Inibição da dihidroorotato desidrogenase

O enzima DHODH é um enzima mitocondrial que catalisa a conversão de dihidroorotato em orotato dentro das mitocôndrias. Esta conversão origina ribonucleótidos pirimidínicos importantes para a replicação celular das células no ciclo celular. Na fase G0, as células não estão ativadas nem em proliferação, pelo que a via de síntese dos ribonucleótidos pirimidínicos está inativa. Quando ocorre um sinal antigénico, os linfócitos T começam a ser ativados entrando na fase G1. Nesta fase a DHODH converte dihidroorotato em orotato que posteriormente é convertido em uridina monofosfato e em uridina trifosfato por um complexo multi-enzimático. A fase G1 prepara as células para a fase S deste ciclo, nesta é necessária uma fonte de energia provinda da uridina trifosfato (189,193,194).

O metabolito A771726 inibe seletivamente a DHODH levando a um decréscimo da síntese de ribonucleótidos impedindo assim que o ciclo celular avance, ficando os linfócitos T bloqueados entre as fases G1 e S do ciclo celular. Desta forma a LEF tem propriedades anti-proliferativas (194).

✓ Inibição da tirosina cinase

A tirosina cinase é um enzima essencial para o crescimento e diferenciação das células na fase G0 do ciclo celular. A LEF inibe este enzima de forma a que o sinal de transdução não ocorra evitando assim o crescimento celular (189).

Para esta inibição ocorrer é necessária uma dose elevada do seu metabolito no plasma, o que não tem sido encontrado em doentes de AR. Tem sido encontrada em concentrações sub terapêuticas, assim pensa-se que a inibição da tirosina cinase não seja o principal mecanismo anti-proliferativo do fármaco (189).

Segurança e efeitos adversos

Os efeitos adversos relatados com mais frequência têm sido os vômitos e náuseas, e o aumento das enzimas hepáticas. Este aumento enzimático poderá indicar uma hepatotoxicidade por parte do fármaco tendo sido estabelecidas recomendações de vigilância hepática frequentes. Estas recomendações são fruto do conhecimento da toxicidade hepática provocada pelo MTX sendo transpostas para o uso de LEF (193,195).

A LEF tal como o MTX, está contraindicado em mulheres grávidas sendo caracterizado como um fármaco X pela classificação da FDA, devendo ser evitado o seu uso, pois este fármaco na gravidez aumenta a probabilidade de ocorrerem abortos espontâneos e de malformações congénitas na criança, pelo que, deve ser feito um plano de anticoncepção nestas doentes (196).

3.3.1.3 Sulfasalazina

A sulfasalazina (SSZ) foi desenvolvida e sintetizada nos anos 30 quando se pensava que a etiologia da AR era de origem bacteriana (197). Este fármaco é utilizado como tratamento de doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn e a colite ulcerosa, sendo segunda linha no tratamento da AR quando os doentes tem contraindicações ou são intolerantes ao MTX (187,198,199). Alguns estudos

randomizados para a AR foram realizados desde a sua descoberta, provando uma eficácia clínica na progressão do dano articular (200–202).

Mecanismo de ação

A SSZ é um pró-fármaco e como tal, após ser absorvida no intestino é clivada pela microbiota intestinal em dois metabolitos, a sulfapiridina e a mesalásina (ácido 5-salicílico ou 5-ASA) no cólon (203,204). Na AR o seu mecanismo terapêutico ainda não está definido, parecendo estar associado à sulfapiridina. Este metabolito é mais ativo que a SSZ, estando envolvido na inibição dos neutrófilos, diminuição da produção das imunoglobulinas e portanto dos FR (136,197).

Segurança e efeitos adversos

Os efeitos adversos mais comuns são náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal. Outros efeitos são passíveis de ser observados, nomeadamente alterações hematológicas como a neutropenia e trombocitopenia (197,205).

Apesar da incidência destes efeitos adversos a SSZ é opção terapêutica de excelência em doentes de AR grávidas ou a amamentar, pois contrariamente ao MTX e à LEF que estão contraindicados (196), não possui caráter teratogénico, risco de anomalias fetais ou risco para o lactente, pelo que poderá ser uma opção terapêutica neste grupo de doentes (196,206).

3.3.1.4 Hidroxicloroquina

A hidroxicloroquina (HCQ) é o fármaco antimalárico mais utilizado no tratamento da AR. O seu mecanismo de ação na doença permanece desconhecido sendo que, pensa-se que ocorra uma supressão da proliferação de linfócitos T. Este fármaco parece ter também ação inibitória no efeito das citocinas pró-inflamatórias (136,207).

Apesar de ter uma eficácia terapêutica reduzida por comparação aos outros tDMARD's, pode ser utilizada em monoterapia quando a doença apresenta uma atividade baixa. No entanto, esta prática não é muito usual, visto que não foi comprovada uma redução do dano articular (208,209).

Assim sendo, é recomendada a sua utilização numa terapêutica combinada, principalmente com o MTX em terapêutica dupla ou com o MTX e a SSZ em terapêutica tripla (199). É um fármaco adjuvante na terapêutica combinada uma vez que, vários estudos demonstram um aumento do efeito terapêutico dos demais tDMARDs em

associação com a HCQ, tanto na sintomatologia geral da doença como na progressão do dano articular (210–212).

Segurança e efeitos adversos

Apesar da HCQ normalmente ser bem tolerada, podem ser sentidos efeitos adversos ligeiros, como náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Estes sintomas tendem a cessar quando a terapêutica é descontinuada (212). Com o uso continuado e com elevadas doses deste fármaco, poderão aparecer problemas oftálmicos relacionados com toxicidade da HCQ na retina, nomeadamente retinopatias. Para tal foram desenvolvidas normas pela Academia Americana de Oftalmologia com o objetivo de controlar a incidência dos problemas oftálmicos nos utilizadores do fármaco (213).

Assim todos os pacientes após um ano de utilização da HCQ são alvo de um exame minucioso ao sistema visual, servindo de base para a comparação com os próximos exames (214). Após este exame a periodicidade do controlo é influenciada pelos riscos a que o doente está associado: doentes que tenham uma dose baixa, não façam terapêutica concomitante com tamoxifeno e que não tenham comorbilidades renais nem oftálmicas, apresentam uma periodicidade de 5 anos; já para os doentes com a presença de um ou mais destes fatores, é recomendado um controlo mais frequente, por ano (214).

3.3.2 DMARDs biológicos

Os bDMARDs são um conjunto de fármacos que revolucionaram a terapêutica da AR na última década, utilizando para tal, técnicas de recombinação genética, resultando em anticorpos monoclonais específicos e com grande interesse no tratamento da patologia. Cinco classes farmacológicas de biológicos estão aprovadas como parte do arsenal terapêutico na AR: 1) Inibidores do TNF- α ; 2) Inibidores da IL-1; 3) Inibidores da IL-6; 4) Depletors dos linfócitos B; 5) Inibidores da co-estimulação dos linfócitos T (215).

3.3.2.1 Inibidores do TNF- α

Devido ao papel do TNF- α na patologia da AR, este mediador da inflamação é um alvo terapêutico pertinente na doença. O TNF- α induz uma cascata inflamatória composta por IL variadas, células inflamatórias e destruição articular, conseqüentemente, o seu bloqueio leva a uma diminuição do edema e dano articular, tornando-se assim mais acessível a remissão da doença (216).

Estão aprovados e disponíveis como opção terapêutica desta classe farmacológica cinco fármacos: Infiximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab Pegol e Golimumab.

Infiximab

O infiximab foi primeiramente aprovado para o tratamento da doença de Crohn, sendo mais tarde o primeiro inibidor do TNF- α na AR. Previne a ligação das moléculas de TNF- α aos seus recetores na membrana celular inibindo os processos biológicos por ele regulados (217). Outra função atribuída a este fármaco é a regulação da resposta imunológica dos linfócitos Treg, promovendo assim a função natural destas células, a regulação da auto-imunidade e a supressão de citocinas pró-inflamatórias oriundas dos linfócitos T e monócitos (218).

O infiximab é o único dos inibidores do TNF- α com administração via intravenosa tendo a sua dose adaptada ao peso do doente, sendo que a dose recomendada é de 3 mg/kg (219).

Em diversos estudos é comprovada a eficácia do infiximab em monoterapia e em combinação com o MTX, tendo sido verificada uma melhoria do dano articular, do edema e dor e até mesmo nos parâmetros bioquímicos PCR e VGS, aquando de uma terapêutica combinada com o infiximab e o MTX (220,221).

No estudo randomizado de Clair *et. al.* (222), com duração de 54 semanas, dividiu-se os pacientes em três grupos: o grupo MTX mais placebo (grupo 1); o grupo MTX mais 3 mg/kg de infiximab (grupo 2); o grupo de MTX mais 6 mg/kg de infiximab (grupo 3). Foi possível verificar que no final das 54 semanas, o grupo 1 apresentava 15% de pacientes em remissão, 21,2% de remissão no grupo 2 e 31% de remissão no grupo 3 (ver gráfico 3.2).

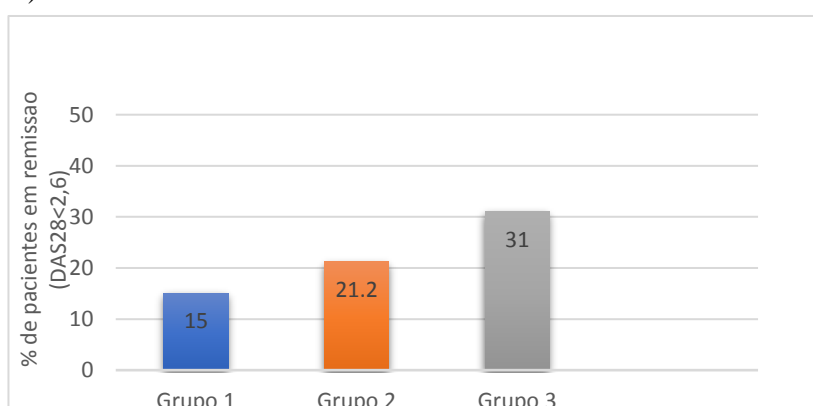


Gráfico 3.2-Percentagem de pacientes de cada grupo que após 54 semanas de estudo entraram em remissão (adaptado de *St Clair* (222)).

É assim possível concluir que é uma mais valia tanto para a diminuição da atividade da doença como para alcançar a remissão desta, a administração aos pacientes de uma terapêutica combinada de infliximab com MTX.

Etanercept

O etanercept é composto por um dímero recombinante composto por duas proteínas recetoras do TNF ligadas a uma porção Fc de imunoglobulina 1 humana, porção esta, utilizada para potenciar o tempo de semi-vida do fármaco (223).

A sua estrutura química distingue-o dos outros inibidores do TNF- α , pois este inibe competitivamente tanto a ligação das moléculas de TNF- α como das moléculas TNF- β (linfotoxina) aos seus recetores de superfície na célula, inativando as suas funções pró-inflamatórias (223).

Tem uma administração por via subcutânea (SC) com regimes terapêuticos diferentes dependendo da dosagem mas iguais na sua eficácia: 50 mg por semana ou 25 mg duas vezes por semana (224). Após a administração subcutânea, este fármaco apresenta um tempo de semivida de aproximadamente quatro dias (224).

Estudos controlados de doentes com AR a quem foi administrado etanercept em combinação com o MTX *versus* MTX em monoterapia, mostraram ocorrer melhorias na redução da atividade da doença e na evolução das progressões de erosão articular quando se optam por uma terapêutica com o biológico mais o MTX do que apenas na monoterapia com o MTX (225–227).

No estudo de *Hyrich et. al.* (228), foi comparada a resposta ao etanercept em monoterapia *versus* etanercept com MTX. É possível verificar que apesar de ter eficácia quando administrado em monoterapia, usado em combinação com o MTX tem um efeito terapêutico sobre a atividade da doença maior, pelo que é recomendado a sua combinação com este tDMARD ou com outro. (228).

Adalimumab

O Adalimumab é um AC monoclonal inteiramente humano, é uma imunoglobulina 1 (IgG1) recombinada com afinidade para o TNF- α humano. Como tal, este fármaco liga-se especificamente ao TNF- α impedindo a sua interação com os seus recetores na superfície celular (136).

É administrado por via SC a cada duas semanas com uma dose de 40 mg, tendo um tempo de semi-vida entre 6 a 14 dias (219,229). O efeito terapêutico deste fármaco é sentido com rapidez. Em combinação com o MTX apresenta uma eficácia mais elevada do que o MTX em monoterapia, reduzindo os sinais e sintomas da AR, inibindo a progressão articular e potenciando a qualidade de vida e a produtividade laboral (228,230–232).

Um outro estudo duplamente cego (233), avalia a eficácia e segurança do adalimumab com MTX versus adalimumab em monoterapia ou MTX em monoterapia. Os doentes foram randomizados em três grupos: o grupo 1 foi tratado com 40 mg de adalimumab por via SC a cada 15 dias e 20 mg de MTX por semana; o grupo 2 foi tratado com os mesmos 40 mg de adalimumab SC mas em monoterapia a cada 15 dias; e o grupo 3 foi tratado com o MTX oral em administração semanal e em monoterapia.

No final do primeiro ano de estudo, ocorreram melhorias na atividade da doença dos doentes: o grupo 1 apresentou uma resposta ACR50 em 62% dos pacientes, o grupo 2 e o grupo 3 apresentam resposta ACR50, em 41% e 46% dos pacientes tratados. Após o segundo ano de estudo, 49 % dos pacientes que pertenciam ao grupo 1 alcançaram a remissão da doença.

Em suma, a utilização do adalimumab em combinação terapêutica com o MTX é uma boa opção para a melhoria dos doentes e até o alcance da remissão da AR.

Certolizumab Pegol

Um dos mais recentes inibidores do TNF- α é o certolizumab Pegol. Este fármaco trata-se um fragmento antigénico (Fab, do inglês *fragment antigen-binding*) de um anticorpo anti-TNF- α conjugado com cadeia de polietilenoglicol. Atua ligando-se ao TNF- α impedindo-o de interagir com os seus recetores na superfície celular (234).

Num estudo duplamente cego, com uma duração de 24 semanas foi avaliada a eficácia e a segurança do certolizumab pegol em monoterapia por comparação ao placebo

(234). Neste estudo 220 pacientes foram randomizados em dois grupos: grupo 1 foi tratado com 400 mg por vi SC do fármaco a cada 4 semanas, enquanto que o grupo 2 foi tratado com placebo. No final das 24 semanas o grupo 1 obteve uma resposta significativamente maior que o grupo placebo, obtendo uma diminuição na atividade da doença e nos sinais e sintomas que lhe estão associados. Com este estudo pode-se concluir que o certolizumal pegol apresenta eficácia sobre a AR quando utilizado em monoterapia, pelo que, poderá constituir uma opção terapêutica na doença.

Noutro estudo (235), duplamente cego, um total de 619 pacientes foram tratados durante 24 semanas. Um dos grupos foi administrado o 400 mg do fármaco por via SC nas semanas 0, 2 e 4, seguidos de 200 mg ou 400 mg de certolizumab a cada 2 semanas, concomitantemente com MTX, controlado por um segundo grupo com MTX e placebo. Comprovou-se que no final das 24 semanas os grupos tratados com a combinação do certolizumab com MTX apresentavam uma diminuição da atividade global da doença com diminuição do envolvimento articular e do número de articulações edemaciadas. A progressão radiológica do dano articular também mostrou diminuição nos doentes tratados com o fármaco por comparação aos doentes do placebo.

Outros autores evidenciam ainda a eficácia do certolizumab aquando de uma resposta não adequada com o MTX sendo que avaliando o risco/benefício é uma opção terapêutica a considerar para os doentes com AR moderada a severa (236,237).

Golimumab

Este fármaco apresenta uma estrutura semelhante à estrutura do infliximab. É administrado por via SC com uma dose recomendada de 50 mg de 4 em 4 semanas (229).

A eficácia do golimumab tem sido avaliada em diversos ensaios clínicos. Num estudo (238), com 444 pacientes randomizados em quatro grupos: no qual o grupo 1 foi tratado com MTX mais placebo; o grupo 2 com 100 mg de golimumab mais placebo; o grupo 3 com 50 mg de golimumab e MTX e por fim o grupo 4 foi tratado com 100mg de golimumab e MTX. Após 14 e 24 semanas de estudo foram coletado os dados a analisados. Na semana 14 do estudo, 33% dos doentes do grupo 1, 55,1 % dos pacientes do grupo 3 e 56,2% dos pacientes do grupo 4, viram a atividade da sua doença reduzida significativamente. No grupo 2 os resultados não foram estatisticamente significativos.

Na semana 24 os resultados mantiveram-se promissores, com a continuação da resposta positiva da atividade da doença ao fármaco. Sendo que a terapêutica combinada do golimumab com o MTX tem respostas melhores nos doentes do que ambas os fármacos em monoterapia. Não ocorreram diferenças significativas de eficácia em relação aos grupos com doses de golimumab diferentes (grupo 3 e grupo 4) pelo que os autores concluem não haver diferenças.

Também é possível concluir-se sobre a atuação deste fármaco na progressão do dano articular. Num estudo *Emery et. al.*, os doentes foram divididos em 4 grupos de tratamento com o seguinte esquema: grupo 1 – MTX mais placebo; grupo 2- 100 mg de golimumab mais placebo; Grupo 3- 50 mg de golimumab mais MTX; grupo 4- 100 mg de golimumab mais MTX. Foram feitas duas abordagens diferentes neste estudo, a primeira um estudo da eficácia do golimumab em pacientes que não tinham tomado mais que 3 semanas de MTX (Abordagem GO-BEFORE), e a segunda abordagem, para pacientes que já apresentavam tolerância ao MTX (Abordagem GO-FORWARD).

Pode-se concluir que no estudo GO-BEFORE, a administração de golimumab com MTX inibe mais a progressão do dano radiológico do que apenas o MTX em monoterapia. Apesar destes resultados, não há diferenças significativas entre a inibição da progressão radiológica para o golimumab em monoterapia e o MTX em monoterapia. No estudo GO-FORWARD não houve resultados significativos nos diversos grupos, ao que os autores atribuem ao desenho do estudo em si (239).

Em suma, conclui-se que apesar de demonstrar, à semelhança dos demais inibidores do TNF- α , sua eficácia como terapêutica de combinação com o MTX, o golimumab em monoterapia não representa uma mais-valia para o tratamento da AR.

Segurança e efeitos adversos dos inibidores TNF- α

Com a utilização desta classe farmacológica nas doenças autoimunes tornou-se pertinente uma avaliação dos riscos associados à sua utilização. Estes fármacos estão relacionados com uma maior incidência de infeções quer pelas bactérias próprias da microbiota do doente quer por infeções oportunistas (229). Dá-se um realce importante ao risco da reativação de tuberculose latente, principalmente associada com a utilização de infliximab e adalimumab, sendo que poderá também estar associada ao etanercept mas

com menos incidência (240). Assim está recomendada uma avaliação para a tuberculose latente nos doentes antes do início da administração dos fármacos (236).

Outro efeito que poderá fazer-se sentir é o efeito da imunogenicidade, isto é, os mecanismos imunológicos próprios do doente para com os fármacos. Como os inibidores dos TNF- α são biologicamente ativos poderá ocorrer a produção de Ac's anti-fármaco e uma resistência adquirida ao medicamento(241). Estes Ac's são os responsáveis pela perda de eficácia ao longo do tempo, sentida pelos doentes a quem são administrados estes fármacos, e em casos mais graves por reações anafiláticas e choque passado pouco tempo após a administração. Estas reações de tolerância farmacológica são fruto da formação de complexos de Ac's anti-fármaco com as moléculas do inibidor (242)(243).

Embora em percentagens diferentes, todos os inibidores do TNF- α podem provocar a formação destes Ac's específicos levando a percas de efetividade. Para contrariar este cenário tem sido evidenciado que o uso concomitante de imunossuppressores diminui em 74% a formação destes Ac's. É mais uma razão que engrandece a administração concomitante de tDMARDs como o MTX com esta classe terapêutica, uma vez que ocorre uma diminuição dos Ac's anti-fármaco e uma melhor a resposta aos inibidores TNF- α (244).

3.3.2.2 Inibidores dos recetores de IL-1

Anacinra

A anacinra é um antagonista do recetor tipo 1 das IL-1 (IL-1R1), e como tal inibe competitivamente a atividade biológica das IL-1, pois impede a ligação destas ao seu recetor (187). A anacinra é o único inibidor das IL-1 aprovado para o tratamento na AR, é administrado por via SC com uma dose de 100 mg por dia (229). Está aprovado para uso concomitante com o MTX, tendo sido evidenciada a sua eficácia na resposta da doença.

Num estudo onde são incluídos cinco ensaios clínicos, um total de 2846 pacientes foram distribuídos aleatoriamente por grupos: um grupo de controlo com placebo e outro grupo com a administração de doses diárias de 50 a 150 mg de anacinra.

Após 24 semanas foram analisados os dados e constatou-se uma ligeira melhoria na atividade global da doença com respostas ACR20 em 38% dos doentes do grupo do

faramco, enquanto que no grupo placebo a percentagem foi de 23%. Os resultados dos critérios ACR50 foram de 18% para o grupo da anacinra e 7% para o grupo placebo. Foi também observado um grande numero de efeitos adversos, sendo mais comum a reação no local da picada da administração, ocorrendo 71% no grupo do fármaco e 28% no grupo placebo. Os autores concluíram que apesar de eficaz, a anacinra possui um efeito terapêutico mais modesto que os TNF- α (245).

Apesar de útil para o tratamento a anacinra ter mostrado efeitos adversos frequentemente. Num estudo de *Fleischmann R. et. al.*, cerca de 92,0 % dos pacientes tratados com anacinra reportaram reações no local da picada envolvendo prurido, *rash* cutâneo e eritema (246).

3.3.2.3 Inibidores dos recetores de IL-6

Tocilizumab

A IL-6 está presente em abundância no plasma e nas articulações dos doentes de AR. Para que a IL-6 intervenha nos processos inflamatórios nas células tem de se ligar ao recetor da IL-6 (IL-6R) formando um complexo IL-6/IL-6R. Este complexo ligar-se-á a uma proteína transmembranar, a glicoproteína 130 (gp130) que sofre dimerização, por fim ocorre uma transdução do sinal para que seja ativada a via STAT e se formem os fatores de transcrição necessários para os efeitos pró-inflamatórios da IL-6 (247).

O tocilizumab é um AC monoclonal, produzido através da recombinação de IgG1 com IL-6R que previne a ligação do complexo IL-6/IL-6R e a dimerização da gp 130 formados e assim evitar a transdução do sinal (247).

Eficácia

A eficácia clínica do tocilizumab tem sim comprovada por vários ensaios clínicos, tanto em monoterapia como em terapia combinada com o MTX. Apresenta uma administração i.v de 8 mg/kg de quatro em quatro semanas. Este fármaco está indicado para o tratamento de AR moderada a severa e quando os doentes não respondem a DMARDs como o MTX e outros bDMARDs, sendo por isso uma terapêutica de 3ª linha na AR (248,249).

Num estudo de *nishimito et.at.*, (250) foram acompanhados durante 5 anos doentes com AR tratados com 4 mg/kg ou 8 mg/kg de 4 em 4 semanas, nas primeiras 2 semanas. Após este tempo foi alterada a dose para 8mg/kg também de 4 em 4 semanas, sempre

com um grupo de placebo como controlo. No final dos 5 anos apenas 94 doentes persistiram no estudo e destes 84% (79 doentes) apresentaram uma resposta ACR20, 69,1% (65 doentes) apresentaram resposta ACR50, e por fim 43.6% (41 doentes) apresentaram resposta ACR70 e entraram em remissão clínica ($DAS28 < 2,6$) 55.3%. Houve uma diminuição generalizada da atividade da doença nestes doentes, pelo que se demonstra a eficácia deste fármaco.

Relativamente aos efeitos adversos, o mais incidente foram as infeções como a pneumonia e bronquite aguda, com uma incidência de 5,7 em cada 100 pacientes. Pelo que se pode afirmar que o tocilizumab é bem tolerado e apresenta uma boa eficácia terapêutica, mesmo ao longo de vários anos de tratamento.

Num estudo de *Maini et. al.*(251), com duração de 16 semanas, participaram doentes com AR severa a moderada com uma terapêutica já efetuada e sem resposta de pelo menos 5 DMARDs, sendo doentes sem resposta aos tDMARDs e aos inibidores dos TNF- α . Foram randomizados os doentes em 7 grupos, três grupos foram tratados com tocilizumab por via intravenosa (i.v) com doses de 2mg/kg (grupo 1), 4mg/kg (grupo 2) e 8mg/kg (grupo3) a cada quatro semanas mais MTX em placebo semanalmente, estes três grupos representam a monoterapia do tocilizumab. Outros três grupos foram formados (grupo 4,5,6), sendo tratados com as mesmas doses de tocilizumab mas com MTX semanalmente, estes grupos representam a terapêutica combinada do tociliumab com o MTX. E por fim um grupo controlo que recebe apenas placebo a cada 4 semanas e MTX semanalmente (ver tabela 3.2).

Tabela 3.2- Tabela esquemática da metodologia de administrações dos fármacos no estudo de *Maini* (adaptado de *Maini* (251))

Monoterapia: tocilizumab (4/4 semanas) mais MTX-placebo			Terapia combinada: tocilizumab (4/4 semanas) mais MTX			Grupo controlo: MTX
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
2mg/kg + placebo	4mg/kg + placebo	8mg/kg + placebo	2mg/kg + MTX	4mg/kg + MTX	8mg/kg + MTX	MTX + placebo

Após análise de resultados, verificou-se que no final das 16 semanas:

- No caso da monoterapia: ocorreu uma melhoria na resposta ACR20 em 61% dos doentes do grupo 2, em 63% dos doentes do grupo 3 por comparação ao grupo do MTX (grupo controlo).
- No caso da terapêutica combinada: ocorreu melhoria dos critérios ACR20 nos grupos 4,5 e 6 em 64%, 63% e 74% respetivamente. As respostas ACR50 e ACR70 foram apenas estatisticamente significativas para o grupo 6.

Estes resultados demonstram que o tocilizumab apresenta uma eficácia na melhoria da doença quer em monoterapia quer em combinação com o MTX. Pelo que pode ser uma opção terapêutica quando não há uma resposta no tratamento com os DMARDs.

Segurança e efeitos adversos

Como efeitos adversos verificados no decorrer da terapêutica com tocilizumab podem ocorrer infeções graves, desordens gastrointestinais (náuseas e dor abdominal), urticárias e prurido, cefaleias e aumento da pressão arterial. Pelo que é recomendada uma monitorização do estado de saúde geral do doente antes e durante o tratamento (252).

3.3.2.4 Depletors dos linfócitos B

Rituximab

O rituximab é o único fármaco biológico desta classe farmacológica aprovado para o tratamento de AR. É um Ac monoclonal quimérico que atua nos recetores CD20 na superfície das células B. A sua ação farmacêutica leva a uma depleção total do número de linfócitos B no sangue periférico e a uma depleção parcial dos linfócitos B presentes na medula óssea e no tecido sinovial (253).

Num estudo de *Rubbert-Roth et.al.*, um total de 326 doentes, que não respondiam adequadamente à terapêutica com MTX, foram organizados aleatoriamente por grupos de tratamento: grupo 1) 2 ×500 mg de rituximab + MTX como tratamento inicial e 2 ×500 mg de rituximab + MTX passado 24 semanas; grupo 2) 2 ×500 mg de rituximab (tratamento inicial) + MTX e 2×1000 mg de rituximab +MTX (pós 24 semanas); grupo 3) 2×1000 mg de rituximab +MTX (tratamento inicial) e 2×1000 mg de rituximab +MTX (após 24 semanas). Pôde-se concluir que no final do estudo (48 semanas) os doentes do grupo 3 apresentam uma resposta maior que os doentes dos restantes grupos, tendo

também apresentado uma maior percentagem de doentes em restado de remissão da doença.

Noutro estudo, um total de 511 doentes foram distribuídos aleatoriamente por três grupos de tratamento, sendo-lhe administrado doses diferentes de rituximab e MTX: grupo 1 tratado com 2 doses de 500 mg de rituximab i.v mais MTX; grupo 2 tratado com 2 doses de 1000 mg de rituximab i.v mais MTX; grupo 3 tratado apenas com MTX (253).

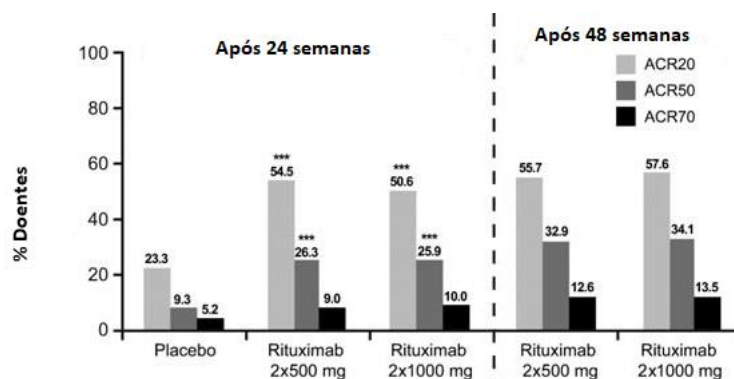


Figura 3.4- Melhorias segundo ACR20/50/70 após 24 e 48 semanas de tratamento: 2×500 mg (grupo 1), 2×1000 mg (grupo 2) e placebo grupo 3). *** $p \leq 0,0001$ (adaptado de Mok (253)).

Na figura 3.4 é possível concluir que os doentes tratados com o fármacos apresentam uma resposta melhor segundo o ACR20//50/70 comparado com o grupo que apenas levou o MTX, assim é verificada uma eficácia superior do rituximab em monoterapia do que o MTX em monoterapia(253)

Em suma, foi comprovada a sua eficácia clínica em doentes com AR moderada a severa, que não responderam positivamente aos tratamentos com o MTX ou com inibidores do TNF- α . Assim é recomendada a sua utilização como terceira linha no tratamento da doença (254).

Segurança e efeitos adversos

Os efeitos adversos mais comuns à administração do rituximab são reações no local da administração, aparecimento de imunogenicidade, infeções graves, hipogamaglobulinemia. Os efeitos adversos menos frequentes são a tuberculose e casos de reativação da hepatite B (253).

3.3.2.5 Inibidores da co-ativação de linfócitos T

Abatacept

O abatacept é um modulador seletivo da co-ativação dos linfócitos T, liga-se aos recetores CD80/86 à superfície das células APC impedindo a sua interação com o recetor CD28 dos linfócitos T e assim, impedindo a ativação destas células (255). Este fármaco faz parte do arsenal terapêutico de terceira linha da AR, pelo que pode ser utilizado com eficácia no tratamento de AR. É uma boa opção para os doentes que não respondem adequadamente ao tratamento com MTX ou com outros bDMARDs (255).

Atente-se no estudo de *Schiff et.al.*(255), onde se formam dois grupos de doentes randomizados, um grupo é tratado com abatacept e com um DMARD, enquanto que o outro grupo é tratado com um placebo e com um DMARD. É de salientar que os doentes envolvidos neste estudo apresentam uma falha terapêutica com um inibidor dos TNF- α . Os resultados para o grupo tratado com o abatacept são promissores, uma vez que, ocorreu um aumento da percentagem de pacientes com melhorias pelos critérios do ACR20/50/70 (ver tabela 3.3)

Tabela 3.3-Percentagem de melhorias na resposta segundo critérios ACR em função do tempo ao longo do estudo (adaptado de *Schiff* (255)).

	Após 6 meses de tratamento	Após 2 anos de tratamento
ACR20	59,4%	56,2%
ACR50	23,5%	33,2%
ACR70	11,5%	16,1%

Após estes resultados, os autores trocaram a abordagem, trocando a administração dos grupos, isto é, o grupo de pacientes que anteriormente foi submetido ao placebo com o DMARD, agora é tratado com abatacept com um DMARD durante dois anos. Os resultados desta troca estão disponíveis na tabela 3.4.

Tabela 3.4-Percentagem de melhorias na resposta segundo critérios ACR após a trocar de metodologia em função de dois anos de estudo (adaptado de Schiff (255)).

Após 2 anos de tratamento	
ACR20	51,5%
ACR50	32,3%
AC570	13,1%

Com esta mudança de metodologia ainda fica mais clara a efetividade do fármaco, visto que, 51,5%, 32,3% e 13,1% dos pacientes do grupo que originalmente era placebo, mostraram melhorias nas respostas em ACR20, ACR50 e ACR70 respetivamente. A atividade da doença também foi influenciada pelo fármaco, uma vez que o grupo tratado com o abatacept apresenta uma diminuição da atividade da doença ao longo dos dois anos de tratamento, bem como um aumento da percentagem de doentes em estado de remissão (255).

3.3.2.6 Inibidores da janus cinase

O tofacitinib é um fármaco recentemente aprovado para o tratamento de AR, é classificado como um inibidor da família de enzimas intracelular Janus cinase (JAK). Tendo sido comprovada a sua eficácia aquando de uma resposta inadequada aos demais DMARDS(256)

Num estudo de Lee et. at.(257), um total de 956 doentes de AR severa foram randomizados em três grupos: Grupo 1) administração de 5mg de tofacitinib 2x/dia; grupo 2) administração de 10 mg de tofacitinib 2x/dia e grupo3) Administração de MTX (grupo controlo).

No final do estudo (24 semanas) foram verificados os resultados presentes na tabela 3.5. Estes resultados são todos estatisticamente significativos (* $p < 0,001$ comparativamente ao grupo do MTX).

Tabela 3.5-Taxas de resposta à terapêutica em função dos critérios de melhoria ACR ao do estudo (adaptado de *Lee (257)*).

	Grupo 1 (% dos pacientes)	Grupo 2 (% dos pacientes)	Grupo 3 (% dos pacientes)
ACR20	64,2%*	64,2%*	42,4%
ACR50	49,3%*	49,2%*	28,3%
ACR70	34,4%*	37,6%*	15,2%
Remissão clínica (DAS28<2,6)	28,7*	22,3%*	9,9%

Com este estudo comprova-se a eficácia da monoterapia do tofacitinib sobre a monoterapia com o MTX, neste estudo verificou-se uma redução dos sinais e sintomas da doença, inclusive a progressão do dano articular (257).

Na figura 3.5 é apresentado um esquema que resume o algoritmo terapêutico recomendado para os médicos reumatológicas, deve ser utilizado como auxílio da estratégia de tratamento, e não dispensa qualquer avaliação física e mental dos doentes de AR. O esquema apresenta algumas recomendações adicionais (199), são elas:

- 1-O diagnóstico deve ser realizado de acordo com os critérios ACR/EULAR de 2010.
- 2- Deve ser feita uma avaliação após 3 meses de tratamento e se for necessário corrigir a terapêutica, o objetivo após os 6 meses passa pela remissão (definida pelo ACR/EULAR) ou a diminuição da atividade da doença.
- 3- o MTX em monoterapia deve ser a primeira linha de tratamento, o que não invalida uma combinação com outro tDMARD se necessário.
- 4- Começar pelos inibidores do TNF- α e posteriormente mudar para os outros bDMARDs.
- 5- A combinação terapêutica mais favorável é MTX + HCQ +SSZ.

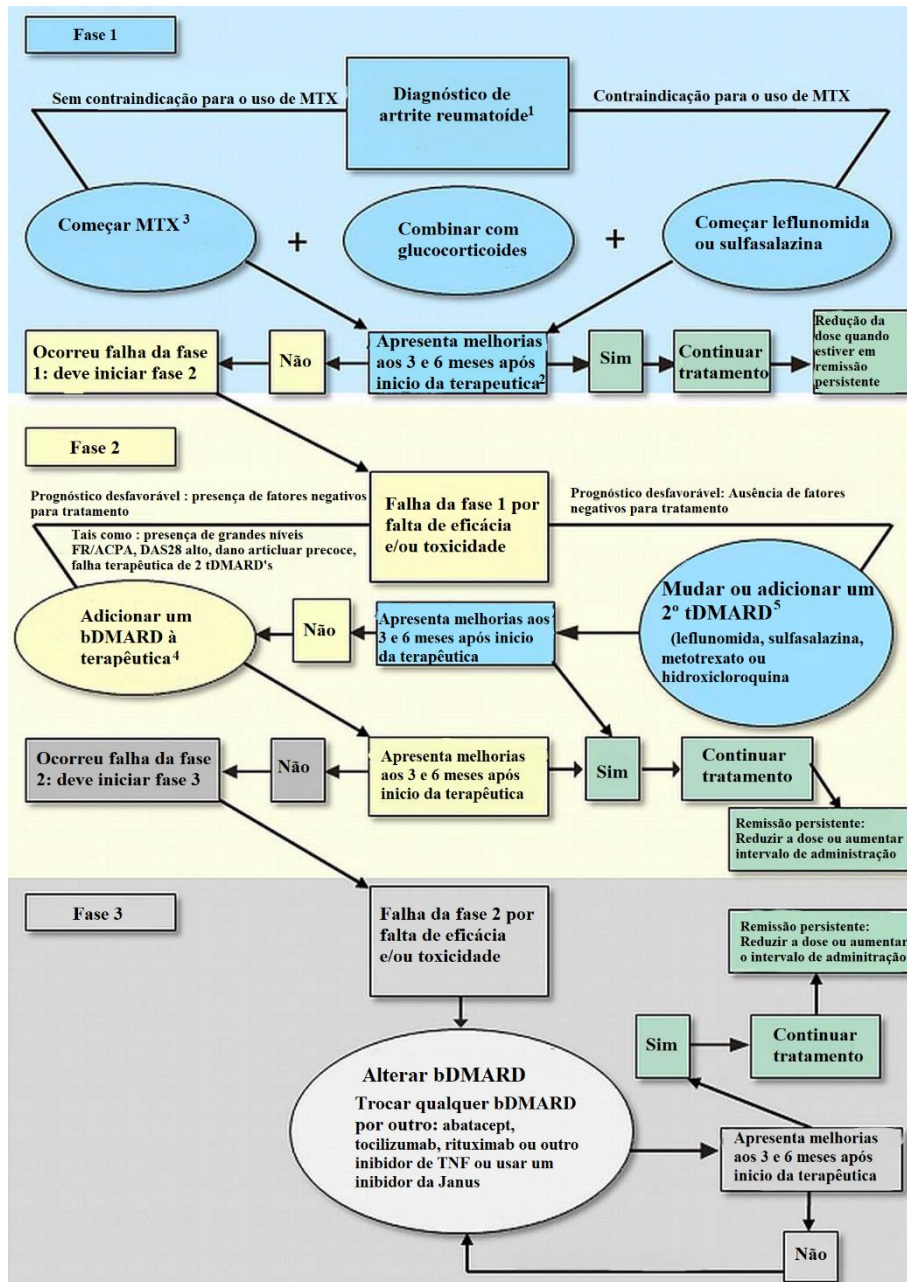


Figura 3.5-Esquema do logaritmo terapêutico (adaptado de Smolen (199)).

4 Farmacogenómica do metotrexato

A farmacogenómica é o estudo dos polimorfismos genéticos que podem influenciar a metabolização dos fármacos, levando a alterações de eficácia e de toxicidade nos doentes. O MTX é usado como primeira linha de tratamento na AR mas também é utilizado como citotóxico na quimioterapia da leucemia linfoblástica aguda (LLA) e em

alguns tumores sólidos. Assim os polimorfismos que estão presentes nos genes da metabolização do fármaco podem ser de veras importantes, para garantir a resposta e no caso da área oncológica a recuperação da saúde (258,259).

Neste capítulo serão abordados alguns dos polimorfismos mais importantes nos diversos genes envolvidos com o mecanismo de ação do MTX, analisando a resposta à terapêutica dos doentes de AR. Igualmente, serão analisados, quando relevantes, alguns desses exemplos na resposta terapêutica dos doentes oncológicos.

4.1 Polimorfismos nos transportadores de influxo

Foram encontrados vários SNP associados à região génica do transportador RFC-1 proveniente do gene SLC19A1, que também lhe dá nome. Como esta proteína é responsável pela entrada do MTX nas células torna-se relevante um estudo do impacto clínico dos polimorfismos neste gene. Esta variabilidade genética foi largamente estudada na área oncológica mas na AR, os estudos dos polimorfismos neste transportador ainda ficam um pouco aquém, levando a uma urgência de estudos (260).

Não obstante, um dos polimorfismos mais investigado nesta temática tem sido o SNP RCF1 80G>A, que resulta na permuta de uma arginina por uma histidina no codão 27, originando a variante rs1051266 (261). Muito já são os estudos que tentam verificar como é que esta variante vai influenciar a resposta destes doentes ao MTX, tendo demonstrado que é responsável por um aumento da atividade do transportador através da sobreexpressão do seu mRNA, levando a um aumento dos níveis de concentração de fármaco dentro das células (261–263).

Num estudo de *Drozdziak et. al*(264), é demonstrado que ocorre uma melhoria dos sintomas da doença após tratamento com MTX, em 21,6% dos pacientes homozigotas G/G, 30,8% dos pacientes heterozigotas G/A e de 47,8% dos pacientes homozigotas A/A. Levando a concluir a probabilidade de remissão da doença é 3,32 vezes maior nos portadores do genótipo AA do que nos portadores do genótipo GG ($p=0,021$). Foi também calculada a frequência alélica nos pacientes e verificou-se que a frequência alélica para o alelo variante (alelo A) é de 62,1% nos pacientes que respondem à terapêutica enquanto que a frequência alélica nos pacientes que não respondem é de 47,8% ($p=0,013$) (264). Estas evidências são apoiadas pelo estudo de *Dervieux et.at* que num total de 105

pacientes com AR verificou com os homocigotas A/A apresentavam melhor resposta ao MTX do que os homocigotas G/G (265).

Quando à toxicidade associada à administração do fármaco, não existe consenso sobre a atuação deste SNP. Não obstante, pensa-se que a presença da variante não estará associado com a toxicidade do medicamento (263).

Na LLA também existem várias linhas de pensamento sobre este SNP, havendo estudos que correlacionam os portadores da variante com uma melhor resposta e estudos que correlacionam com uma resposta ineficaz. Os resultados do estudo de *Gregers et.al.*(266), confirma as mesmas evidências que para a resposta na AR. Neste estudo foi investigado o polimorfismo RCF1 80G>A em 500 crianças com LLA, às quais foram administradas altas doses de MTX e estudada a probabilidade de evento, sendo que é considerado evento uma recaída ou a morte do paciente. Os investigadores observaram que o risco de desenvolver um evento é 50% menor em portadores do genótipo AA do que em portadores dos genótipo AG e GG ($P = 0,046$; IC 95%: 0.25- 1.00)(266).

Por contrapartida, o estudo de *Li et al.*(266), associa uma pior resposta aos portadores do alelo mutado. Neste estudo foram acompanhados 204 pacientes com LLA, aos quais, foram administradas doses elevadas de MTX, de seguida ocorreu o estudo do seu genótipo em função do risco de ter um evento e da concentração plasmática de MTX. Estes investigadores concluíram, como já referido, que os portadores do alelo A apresenta um risco de terem um evento maior comparativamente com os portadores do genótipo GG (OR= 3,0; IC 95%: 1,1-8,1; $P=0,03$). Apresentam igualmente uma probabilidade de sobrevivida livre de evento (EFS) menor comparativamente com os doentes com genótipo GG ($P=0,04$), tendo assim um pior prognóstico (ver figura 4.1). Ainda concluíram que os portadores do genótipo AA apresentam maiores níveis de concentração plasmáticos de MTX por comparação aos restantes genótipos ($P=0,004$). Contudo estes investigadores

não encontraram nenhuma associação entre os níveis plasmáticos de MTX dos doentes e o prognóstico da doença.

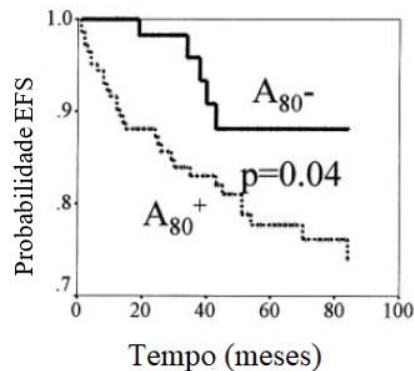


Figura 4.1-Probabilidade de EFS nos pacientes em função do seu genótipo. A₈₀⁺= Presença do alelo mutado; A₈₀⁻ = Ausência do alelo mutado (adaptado de *Li et.al.* (266)).

Outro polimorfismo num gene de transportador parece estar associado à resposta do MTX na AR é o SNP no gene SLC22A11. Este gene está presente no cromossoma 11 e codifica o transportador de aniões orgânicos (OAT4), que é responsável pelo transporte bidirecional nas células tubulares proximais renais, tendo um papel principal na reabsorção tubular do MTX. No SNP ocorre permuta de T por A numa região intrónica, o seu impacto na fisiopatologia renal e na reabsorção do fármaco ainda não é conhecida. Num estudo de Lima et.al. (267), verificou-se que num grupo de pacientes portugueses de AR, os portadores do alelo T apresentam um risco superior de terem uma resposta ineficaz comparativamente aos portadores do genótipo AA (OR (IC 95%)= 0,19 (0,04–0,86); p=0,031).

4.2 Polimorfismos nos transportadores de efluxo

O efluxo do MTX nas células é concretizado pela família de transportadores ABC. Estes transportadores têm capacidade de transportar uma grande variedade de moléculas, gastando ATP para tal. Dentro da família ABC, existem cinco subfamílias de transportadores (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCG) (268)

Um dos transportadores mais estudados é o ABCB1 também conhecido por glicoproteína-P (gp-P). Este resulta da expressão do gene MDR1 e tem sido intimamente associado à resistência farmacológica das células cancerígenas à quimioterapia. Este mecanismo nem sempre é nocivo, pois esta proteína transporta tanto moléculas endógenas

como exógenas, promovendo assim a eliminação de moléculas nocivas ao organismo e impedindo a morte celular (269).

No mecanismo do MTX pensa-se que o efluxo recai, predominantemente, sobre os transportadores ABCC1-4, ABCB1 e ABCG2 (270). Assim tenta-se estudar polimorfismos nos genes destes transportadores com o objetivo de correlacionar tanto a resposta ao fármaco como a toxicidade que o MTX pode fazer recair sobre o doente. Foram evidenciados polimorfismos no transportador ABCB1 e no ABCC1 estatisticamente validos que parecem influenciar a resposta ao MTX nos doentes de AR.

4.2.1 Polimorfismos no transportador ABCC1

Num estudo de lima et.al. (267) , aplicou-se a farmacogenómica para estudar quais os polimorfismos inerentes aos transportadores de efluxo, numa população de doentes de AR portuguesa.

Assim para o transportador ABCC1 foram descobertos dois SNP's que influenciam a resposta do MTX nos doentes de AR quando presentes no gene sozinhos, são eles:

- ✓ ABCC1 A6240G (rs246240): neste SNP ocorre a permuta de uma A por uma G, sendo que ser portador do alelo G aumenta em 5,47 vezes a probabilidade de não obter resposta ao fármaco ($pvalue=0,008$). Assim sendo este SNP provoca uma sobreexpressão do gene do transportador que aumenta o efluxo do fármaco provocando uma baixa da concentração do fármaco nas células logo uma menor resposta terapêutica.
- ✓ ABCC1 G4864A (rs3784864): ocorre um SNP que permuta uma G por uma A, sendo que ser portador do alelo G aumenta 4,24 vezes a probabilidade de não obter resposta terapêutica ($pvalue=0,015$). Neste caso pensa-se que o SNP forma um fenótipo benéfico, pois ocorre a diminuição da expressão do transportador, diminuindo a sua função e como tal diminui o efluxo de MTX da célula.

Outros dois SNPs foram encontrados neste estudo, o ABCC1 G4087C (rs2074087) com permuta de uma G por uma C, e o ABCC1 T5592C (rs35592), com permuta de uma T por uma C. Estes SNPs apresentam uma relevância na resposta ao fármaco só quando associados em haplótipos (tabela 4.1 e tabela 4.2).

Tabela 4.1-Relação entre os alelos para o haplótipo 1 do o gene ABCC1 e a resposta clínica ao MTX. *Alelo x – indica o alelo de referência (adaptado de Lima (267)).

ABCC1 T5592C	ABCC1 A6240G	ABCC1 G4864A	OR (IC 95%)	Pvalue
Alelo T*	Alelo A*	Alelo A	referência	
Alelo C	Alelo G	Alelo G*	7,26 (1,64–32,14)	0,010

Tabela 4.2-Relação entre os alelos para o haplótipo 2 do o gene ABCC1 e a resposta clínica ao MTX. *Alelo x – indica o alelo de referência (adaptado de Lima (267)).

ABCC1 T5592C	ABCC1 G4087C	ABCC1 G4864A	OR (IC 95%)	Pvalue
Alelo T*	Alelo C	Alelo A	referência	
Alelo C	Alelo G*	Alelo G*	4,12 (1,20–14,09)	0,025

As tabelas 4.1 e 4.2 representam a relação entre as combinações alélicas dos haplótipos 1 e 2 no gene do transportador em estudo, e a sua relação com a resposta clínica ao MTX. Uma vez que os SNPs A6240G e G4087C não estão em desequilíbrio de ligação os autores analisaram dois haplótipos distintos: O haplótipo 1 é composto pelos SNP's *ABCC1* T5592C, A6240G e G4864A; e o haplótipo 2 é composto pelo *ABCC1* T5592C, G4087C e G4864A.

Os resultados nas tabelas mostram que para o haplótipo 1, a combinação alélica CGG incorre numa menor resposta clínica nos seus portadores comparativamente aos portadores da combinação alélica de referência TAA (OR= 7,26 IC 95% (1,64–32,14), *pvalue*=0,010). Para o haplótipo 2 os portadores da combinação alélica CGG apresentam uma pior resposta clínica ao MTX comparativamente aos portadores da combinação alélica de referência TGA (OR=4,12 IC 95% (1,20–14,09), *pvalue*=4,12). Assim sendo, fica possível concluir que quando o doente é portador do alelo mutado (alelo G) para a variante do SNP A6240G (no caso do haplótipo 1) e é portador do alelo de referência (alelo G) do SNP G4087C (no caso do haplótipo 2), apresenta uma menor resposta clínica à terapêutica com o MTX (267).

4.2.2 Polimorfismos no transportador ABCB1

Apesar de estudado amplamente para a resistência de fármacos, na AR há muito trabalho investigacional a ser feito. Contudo foram identificados dois SNPs que poderão estar envolvidos na eficácia da resposta ao MTX.

Um dos SNPs encontrado foi o SNP C3435T no exão 26 do gene MDR1, originando uma permuta de uma C por uma T. Apesar de não haver consenso quanto ao seu efeito acredita-se que possa estar envolvido na resposta do fármaco.

Num estudo de Takatori et.al.(271), foram incluídos no estudo 124 pacientes japoneses com AR, aos quais foi administrado MTX e controlados os parâmetros da doença (PCR, VSG, numero de articulações tumefactas, etc.). Após genotipagem verificou-se os resultados presentes na tabela 4.3.

Tabela 4.3-Número de pacientes (em percentagem) com ausência/presença de resposta ao MTX em função do seu genótipo (adaptado de *Takatori* (271)).

	Genótipo CC	Genótipo CT	Genótipo TT	<i>pvalue</i>
Pacientes que respondem ao MTX	47,2%	44,4%	8,3%	0,002
Pacientes que não respondem ao MTX	21,2%	45,5%	33,3%	

Neste estudo concluiu-se que a permuta de uma C por T provavelmente leva a uma sobreexpressão do transportador ABCB1 e um maior efluxo do fármaco para fora da célula, uma vez que, na população em estudo 33,3% dos pacientes com o genótipo TT (homozigotas para a variante) não apresentem resposta ao MTX, enquanto que 47,2% dos pacientes com o genótipo CC (homozigotas de referência) têm uma resposta adequada.

Noutro estudo mais recente, *Kato et.al.*(272), avaliou num estudo retrospectivo o SNP C3435T num grupo de 55 pacientes japoneses medicados com MTX. Neste grupo relacionou a atividade da doença através do índice DAS28 com os genótipos encontrados nos pacientes. Chegou à conclusão que para os pacientes com o genótipo TT apresentava uma atividade de doença menor que os pacientes com o genótipo CC (*pvalue* 0,02). Concluíram igualmente que este SNP não está associado à concentração de moléculas de MTX—pg, tendo provavelmente apenas uma influência na expressão do transportador e no efluxo do fármaco. Assim, os homozigotas para a variante apresentam um fenótipo que responde ao fármaco, o que quererá dizer que com a permuta da base azotada (C>T)

há uma perda de atividade do transportador e consequentemente um menor efluxo do MTX das células (272).

Apesar da disparidade entre os estudos é de salientar que apesar de não existir consenso, este SNP afeta a eficácia do fármaco, pelo que é necessário proceder-se a mais ensaios clínicos para responder à questão essencial: em que sentido é que este SNP influencia o transportador de efluxo ABCB1?

No artigo de *Kato et.al* (272), avaliou-se também a resposta dos doentes ao MTX em portadores do SNP ABCB1 2677G>A/T. Neste SNP ocorre permuta de uma G por uma A ou por uma T. *Kato* e os seus colegas concluíram que para o SNP 2677G>A/T o genótipo AA/AT/TT (homozigotas para as variantes) apresenta uma DAS28 menor que os pacientes com o genótipo GG/GA/GT (homozigotas de referência (GG) ou heterozigotas para a variante (GA/GT)) (ver tabela 4.4) (272).

Tabela 4.4-Avaliação da atividade da doença pelo índice DAS28 em função do genótipo dos doentes para o SNP ABCB1 2677G>A/T (Adaptado de *Kato* (272)).

Genótipo	DAS28
GG	3,93 ± 1,49
GA	3,53 ± 1,09
GT	
AT	2,83 ± 1,05
AA	
TT	

Assim é importante um estudo mais aprofundado destes polimorfismos na AR, uma vez que, ainda não está bem fundamentada esta matéria.

No caso da LLA estão estudados os mesmos dois SNP na resposta ao MTX com uma dosagem mais elevada. Num estudo de *man et.al.*(273), foram genotipados 178 pacientes com LLA aos quais foram administradas doses altas de MTX. A genotipagem permitiu perceber qual a resposta ao fármaco consoante o genótipo dos pacientes. Os investigadores observaram que no SNP 2677 G>T/A, os portadores do genótipo TT e do genótipo TA apresentam maiores concentrações plasmáticas de MTX durante 24 horas,

do que os restantes genótipos ($pvalue=0,012$). Já para o SNP 3435C/T, as concentrações plasmáticas são mais elevadas nos genótipos TT e CT do que no genótipo CC ($pvalue=0,028$).

Estes investigadores também associaram a taxa de remissão total da LLA aos genótipos encontrados. No SNP 2677G>T/A as taxas de remissão completa da doença para os genótipos GG, GT+GA e TT+AA+TA são 20,0%, 60,2% e 33,3%, respetivamente ($pvalue=0,019$), sendo que se pode concluir que são os doentes portadores do genótipo GG os que apresentam menor taxa de remissão completa. No caso do SNP 3435C>G, não houve associação estatisticamente significativa (273).

Em jeito de conclusão, os investigadores afirmam que ambos os SNPs parecem levar a uma diminuição dos níveis de ABCB1, levando a alterações do efluxo do MTX, que parece ser benéfico a uma melhor resposta (273).

4.3 Polimorfismos nos genes dos enzimas relacionados com a glutaminação

Após entrada na célula as moléculas de MTX sofrem reações de poliglutaminação através da FPGS, dando origem a moléculas de MTX-pg. Estes metabolitos são estruturalmente maiores e como tal não sofrem efluxo pelos transportadores, ficando retidas no meio intracelular podendo atuar na via dos folatos. Após exercerem o seu efeito terapêutico estes metabolitos têm de ser excretados da célula pois uma acumulação de MTX-pg pode levar à toxicidade do organismo. Assim cabe ao enzima GGH prevenir esta toxicidade, clivando a cadeia de poliglutamatos levando novamente à formação de moléculas simples de MTX. Estas moléculas apresentam uma estrutura pequena e como tal, conseguem ser excretadas pelos transportadores de efluxo para fora da célula. Este balanço de funções da FPGS e da GGH é importante tanto na toxicidade como na eficácia, sendo assim pertinente o estudo dos polimorfismos inerentes aos seus genes (274).

4.3.1 Polimorfismos no gene FPGS

O gene FPGS é o responsável pela expressão do enzima FPGS e apesar de ter um papel importante no mecanismo de ação do MTX, não demonstra grande valor na influência da sua resposta (275).

Foram encontrados dois SNPs neste gene, o SNP FPGS 114G>A (rs10760502) e o SNP FPGS 1994A>G (rs10106). Após análise da resposta ao MTX dos diferentes genótipos,

os investigadores concluíram que embora ocorra estas permutas de bases azotadas, estes SNPs em nada influenciam a resposta à terapêutica, sendo necessário mais investigação nesta temática (274).

4.3.2 Polimorfismos no gene GGH

Nesta temática foram estudados quatro SNP's no gene da GGH que embora pouco investigados, poderão influenciar a resposta dos doentes de AR ao MTX:

No SNP 354 G>T, ocorre uma substituição de um G por uma T no promotor do gene. Num estudo de *Jekic et. al.*(276), com 184 doentes de AR tratados com MTX pelo menos durante seis meses, concluiu-se que este SNP pode estar relacionado com o mecanismo de resistência ao fármaco por parte das células. Esta ideia foi baseada na análise dos genótipos dos doentes, verificando-se que os pacientes com o genótipo GG apresentavam uma toxicidade medular superior aos demais pacientes. Concluiu-se desta forma que, ser portador do alelo permutado origina uma expressão maior do gene e a uma concentração de GGH elevada na célula, sendo que ocorre uma eliminação mais eficaz de MTX-pg no meio intracelular. Apesar destas conclusões, este estudo não demonstra relação deste SNP com a eficácia do fármaco nestes doentes (276).

No seu estudo *van der Straaten et al* (274), estudou os efeitos dos SNPs 16T>C e 452C>T na eficácia e toxicidade do MTX em 325 doentes de AR. E verificou que para o SNP 16T>C, os portadores do alelo C apresentavam uma probabilidade 2,9 vezes maior de redução da atividade da doença do que portadores do genótipo TT, podendo com isto indicar uma maior resposta ao fármaco pelos homocigotas e heterocigotas da variante, devido a um maior nível de GGH e como tal mais concentração de MTX-pg nas células.

Ainda neste estudo verificou-se ainda a ocorrência de um outro SNP, o 452C>T, que apesar de não estar associado na resposta do fármaco, quando encontrado no haplótipo 452C-16T está associado a uma boa resposta clínica por parte dos doentes. É notado que heterocigotas do haplótipo 452C-16T apresentam uma probabilidade 2,7 vezes maior de reduzirem o índice DAS28 e como tal, reduzirem a atividade da doença. Estes resultados indicam que os portadores do alelo C, apresentam um efeito potenciador do SNP 16T>C, levando a uma maior acumulação de MTX-pg e provavelmente uma maior eficácia na resposta à terapêutica (274).

Outro SNP estudado é o SNP 401 C>T, no qual ocorre uma permuta de uma C por uma T na região do promotor do gene da GGH, assim acredita-se que esta alteração

poderá levar a um aumento da atividade do enzima. Com esta atividade ampliada, menor vai ser a concentração de MTX-pg na célula, podendo levar a uma menor resposta farmacológica (277).

Alguns estudos foram realizados para comprovar esta teoria nos pacientes com AR e assim concluir sobre a influência deste SNP na resposta ao MTX. No entanto as suas conclusões mostram-se pouco coesas e sem base científica para demonstrar esta associação. Como tal, acredita-se que este SNP influencia a atividade da GGH e os níveis de MTX-pg na célula, mas ainda é preciso mais investigação para inferir na resposta ao MTX (238,262,278).

4.4 Polimorfismos nos genes dos enzimas alvo do metotrexato

4.4.1 Polimorfismos no gene da enzima DHFR

São vários os autores que se debatem com o estudo de polimorfismos no gene da DHFR, o principal alvo terapêutico do MTX. Tendo sido encontrados vários SNPs neste gene, que são candidatos a uma influência na resposta dos doentes de AR ao MTX. Sucede que após a análise dos resultados, grande parte destes SNPs não está associada à efetividade de resposta ao fármaco (279)(280).

Não obstante, foram descobertos dois SNPs, o SNP 317A>G (rs70991108) e o SNP rs1643650, que parecem estar associados com a resposta a esta terapêutica nos doentes de AR (270).

No SNP 317A>G os pacientes que são homozigotas de referência, ou seja, portadores do genótipo AA, parecem apresentar uma menor resposta ao MTX do que os genótipos A/G e G/G (275).

Já no SNP rs1643650 ocorre a permuta de uma T por uma C no intrão três do gene DHFR. No estudo de Salazar et. al.(280), foram genotipados pacientes de AR aos quais foi prescrito MTX em monoterapia, estando os resultados indicados na tabela 4.5.

Tabela 4.5-Análise dos genótipos dos pacientes em estudo e correlação com a resposta ao MTX (adaptado de *Salazar* (280))

Genótipo	Numero de pacientes	Pacientes que respondem n. (%)	Pacientes que não respondem n. (%)
T/T	26	16 (61,5%)	10 (38,5%)
T/C	27	22 (81,5%)	5 (18,5%)
C/C	8	7 (87,5%)	1 (12,5%)

Assim pôde-se concluir que os pacientes com os genótipos C/C e T/C apresentam melhor resposta ao fármaco, uma vez que, dentro de cada genótipo existe um maior número de pacientes classificados como “pacientes que respondem” à terapêutica (280).

Apesar desta enzima ter um papel marcante no mecanismo de ação do fármaco, existem ainda poucos estudos que comprovem a influência da sua variabilidade genética com a resposta quer na concentração de MTX no plasma dos doentes de AR, quer na sua eficácia na redução da atividade da doença e por consequência nos sinais e sintomas da mesma.

Este gene também foi estudado no caso dos pacientes de LLA, tendo sido encontrados três SNPs (-317A>C, -1610C>G/T e -680C>A) na região do promotor do gene e uma mutação ins/del de 19-pb, parecem influenciar a resposta à terapêutica (281).

Num estudo de *Dulucq et al.*(282), verificou-se que para o SNP -317A>C os portadores do genótipo AA apresentam uma probabilidade de EFS menor do que os outros genótipos, verificando-se um pior prognóstico para os homozigotas de referência (ver figura 5.2). Estes investigadores verificaram igualmente que, para o SNP -1610C>G/T, os portadores do alelo T têm uma probabilidade EFS mais alta comparativamente aos portadores do genótipo CC, levando a um prognóstico mais otimista (ver figura 4.2)

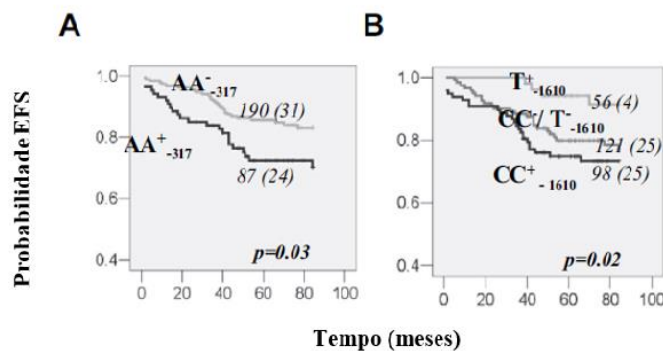


Figura 4.2- Sobrevivência livre de evento (EFS) para doentes com LLA segundo o seu genótipo para os SNP's -317A>C e -1610C>G/T. A- Curvas EFS para os pacientes que têm o genótipo AA (AA+) e para os pacientes que não têm AA-, para o SNP -317A>C. B- Curvas EFS de acordo com o SNP -1610C>G/T (adaptado de *Dulucq* (282))

Posteriormente foram analisados 5 haplótipos, resultantes da conjugação destes três SNP's. Fazem parte do haplótipo 1* (1a* e 1b*) os alelos -317A e -1660C, haplótipo 4* é o único a apresentar o alelo -1610T e o haplótipo 5* (5a* e 5b*) difere do haplótipo 1* pois apenas continha o alelo -317A. Após análise dos haplótipos com a probabilidade de EFS, verificaram que os portadores do haplótipo 1*, referidos no estudo como 1+*, têm

uma probabilidade EFS mais baixa que os 1⁻*, tendo assim maior probabilidade de ter eventos. Já para os portadores do haplótipo 4* (4⁺*) têm uma EFS maior que os 4⁻* tendo assim, uma menor probabilidade de eventos no futuro (ver figura 4.3). O haplótipo 5* não apresenta diferenças significativas.

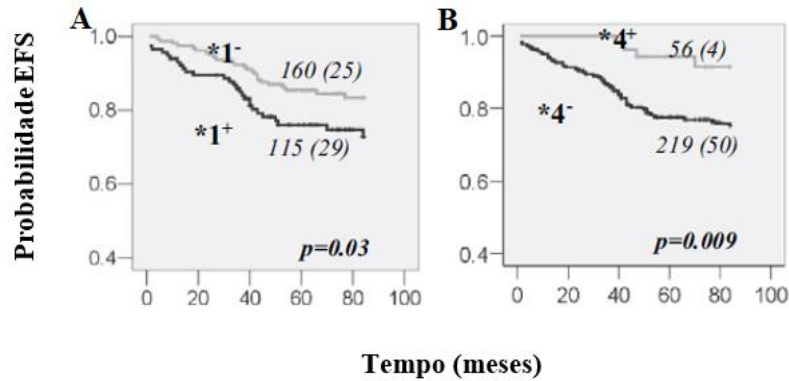


Figura 4.3-Sobrevivência livre de evento (EFS) para doentes com LLA segundo o seu genótipo para os SNP's -317A>C e -1610C>G/T. A- Curvas EFS para os pacientes com presença/ausência do haplótipo 1*B- Curvas EFS para os pacientes com presença/ausência do haplótipo 4* (adaptado de Dulucq (282)).

4.4.2 Polimorfismos no gene da enzima MTHFR

Apesar de não ser diretamente inibida pelo MTX nem pelo MTX-pg, a MTHFR catalisa a conversão de 5-10-metilTHF em 5-metilTHF, utilizados na reação de formação de poliaminas inflamatórias. É um dos enzimas onde a atenção dos investigadores recaiu, contudo, ainda não há um consenso generalizado sobre a influência dos seus polimorfismos na resposta dos doentes que estão em terapêutica com o MTX. Existem dois SNPs que foram já estudados por vários autores de forma a correlacioná-los com a eficácia da resposta na doença (270).

O SNP C677T causa uma substituição do AA alanina numa valina no codão 222 do gene MTHFR, sendo responsável pela variante rs1801133, este SNP pode levar à perda de 30-60% da atividade do enzima. Por sua vez o SNP A1298C, leva à permuta de uma glutamina por uma alanina, também no codão 222, que cria a variante rs1801131 (265).

Num estudo de Lima *et.al.*(283), foram genotipados para o SNP C677T, 233 pacientes portugueses com AR administrados com 15mg de MTX por semana. Na tabela 4.6, são apresentados os resultados deste estudo de genoma na população em estudo. Desta tabela é possível retirar que 105 dos pacientes eram homozigotas de referência, 99 eram heterozigotas para a variante e 29 eram homozigotas para a variante.

Tabela 4.6-Descrição da população em estudo baseada no seu genótipo para o SNP C677T (adaptado de Lima (283)).

Nº. pacientes (% pacientes) do total de 233	Genótipo
105 (45,1%)	677 CC
99 (42,5%)	677 CT
29 (12,4%)	677 TT

Após a genotipagem, os pacientes foram classificados em dois grupos: pacientes com resposta e pacientes sem resposta à medicação. Esta classificação teve como suporte o índice DAS28. Assim, foram classificados como “Pacientes com resposta” se após 2 meses o seu $DAS28 \leq 3,2$ e como “pacientes sem resposta” se o $DAS28 > 3,2$. No final da seleção foram encontrados 104 pacientes que respondem e 128 pacientes que não apresentam resposta à terapêutica. Posteriormente relacionou-se a sua resposta com o genótipo que lhe é inerente (ver tabela 4.7).

Tabela 4.7-Correlação entre resposta ao MTX com variabilidade para o SNP C677T (adaptado de Lima (283)) *pvalue**- estatisticamente significativo. I.C. – intervalo de confiança.

MTHFR C677T, rs1801133	Nº. pacientes que respondem (%)	Nº. pacientes que não respondem (%)	<i>pvalue</i>	OR (I.C. 95%)
CC	52 (49,5)	53 (50,5)		Referência
CT	46 (46,5)	53 (53,5)	0,662	1,13 (0,65–1,96)
TT	7 (24,1)	22 (75,9)	0,015*	3,08 (1,21–7,84)
CC	52 (49,5)	53 (50,5)		Referência
Portador do alelo T	53 (41,4)	75 (58,6)	0,215	1,39 (0,83–2,33)
Portador do alelo C	98 (48,0)	106 (52,0)		Referência
TT	7 (24,1)	22 (75,9)	0,015*	2,91 (1,19–7,10)

Como é possível ver na tabela 4.7, os autores correlacionam o tipo de genótipo com a resposta clínica dos doentes. Para homozigotas para a variante (genótipo TT) existe um risco aumentado em 3,08 vezes, de não obterem resposta ao fármaco quando comparado com os homozigotas de referência. Os portadores do genótipo TT também apresentam maior risco de falha na terapêutica por comparação aos portadores do alelo C (OR=2,91).

Neste estudo os autores concluem que a variante está associada a uma potencial falha de resposta ao MTX, provavelmente pelo decréscimo da atividade intrínseca da enzima (283).

Vários são os estudos concordantes com estas conclusões (270,284), é também caso do estudo de *Soukup et.al* (285), também com pacientes europeus. Neste estudo após classificarem os pacientes como pacientes com resposta e pacientes sem resposta, averiguaram a sua resposta em função do seu genótipo.

Assim concluíram que o SNP C677T estará associado a uma redução da resposta ao MTX, uma vez que para homozigotas de referência (677CC) o Δ DAS28 (DAS28 entre o início do estudo e 6 meses depois) é maior cerca de 0,085 pontos do Δ DAS28 para os pacientes heterozigotas para a variante (677CT). Estes heterozigotas também foram comparados com os homozigotas para a variante (677TT), sendo que o genótipo TT apresenta o Δ DAS28 1,448 pontos maior que o genótipo CT (ver figura 4.4) (285).

É também analisada a influência do SNP A1298C, onde através dos mesmos métodos de análise, verificaram que existe uma maior probabilidade de ocorrer uma resposta inadequada para o genótipo AC por comparação ao genótipo CC, uma vez que o genótipo CC apresenta um Δ DAS28 maior cerca de 1,691 pontos (*pvalue*=0,015).

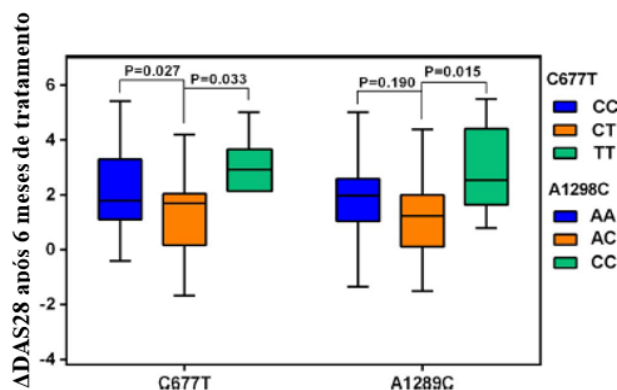


Figura 4.4-Comparação do Δ DAS28 após 6 meses de tratamento com os genótipos para os dois SNP's (adaptado de *Soukup* (285)).

Com estes estudos comprova-se a existência de uma relação entre os SNPs apresentados e a eficácia da terapêutica nos doentes caucasiano, ainda que pouco fundamentada. De seguida são analisados os artigos que retratam esta realidade em povos não caucasianos.

Um estudo de *Puranik et.at.*(286), onde participaram 212 pacientes asiáticos que foram genotipados e classificados como “pacientes que respondem” e pacientes que não respondem” de acordo com a ausência ou presença de uma resposta segundo os critérios ACR50 durante 12 meses e critérios ACR20 durante 6 meses. Assim respondem os pacientes que tiveram após 12 meses de estudo uma melhoria em 50% dos critérios que definem a doença pela ACR e uma melhoria de 20% destes mesmos critérios após 6 meses de estudo. Os genomas destes pacientes foram testados para vários polimorfismos, nos quais estão inseridos os SNP C677T e A1298C.

Para o SNP C677T os resultados da genotipagem são apresentados na tabela 4.8, para o SNP A1298C os resultados estão presentes na tabela 4.9. Após serem conhecidos os seus genótipos para cada SNP foram classificados conforme a sua resposta, sob os critérios acima referidos e concluiu-se que apenas para o SNP A1298C a associação com a resposta é significativa e que os portadores do alelo A (genótipo AA e AC) apresentam uma melhor eficácia que os portadores do genótipo CC, tendo uma probabilidade de 2,6 vezes maior de reduzir a atividade da doença pelos critérios ACR50 do que o genótipo CC ($pvalue=0,02$)(286).

Tabela 4.8-Correlação dos genótipos para o SNP C677T com o número de pacientes em estudo (adaptado de *Puranik* (286)).

Tipo de genótipo	Nº. pacientes (217)
AA	58
AC	95
CC	64

Tabela 4.9-Correlação dos genótipos para o SNP A1298C com o número pacientes em estudo (adaptado de *Puranik (286)*).

Tipo de genótipo	Nº. pacientes (217)
CC	166
CT	49
TT	2

Num outro estudo concordante com estas conclusões, *Tomomi Kato et.al.(287)*, genotipou os pacientes japoneses com AR para vários enzimas, na enzima MTHFR analisaram os SNP's C677T e A1298C. Para o SNP C677T não conseguiram concluir significativamente a sua influência na resposta ao farmaco.

Para o SNP A1298C encontrou-se correlação com a resposta ao MTX pelos pacientes, esta correlação é obtida pela análise do índice DAS28 em relação ao genótipo e está apresentado na figura 4.5.

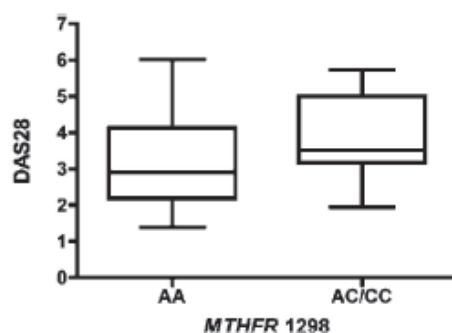


Figura 4.5-Comparação do índice DAS28 dos doentes de artrite com os seus genótipos para o SNP A1298C p value= 0.04, (adaptado de *Tomomi kato (287)*).

Na figura 4.5 foi possível observar a diferença nos índices que marcam a atividade da doença, para o genótipo AA o DAS28 é de $3,15 \pm 1,15$ e para os genótipos AC ou CC (portadores do alelo mutado) o índice DAS28 é de $3,92 \pm 1,20$. Pode-se concluir que os homocigotas de referência (genótipo AA) apresentam uma atividade da doença mais reduzida que os portadores do alelo mutado, pelo que é para o genótipo AA que há uma maior eficácia farmacológica com o MTX em monoterapia (287).

Na quimioterapia antineoplásica, os SNPs C677T e A1298C estão igualmente relacionados com a eficácia da terapêutica. Num estudo de *D'Angelo et.al.*(288), investigaram qual a influência destes SNP's na LLA. Assim, foi demonstrado que o SNP MTHFR 677 C>T, apresenta um maior risco de eventos adversos após genotipagem de todo o grupo de pacientes ($p=0,008$). No caso do polimorfismo MTHFR 1298A>C não foram encontradas diferenças entre os pacientes estratificados por genótipos ($p=0,7$) (ver tabela 4.10). Ainda foi verificado que os doentes com o genótipo TT apresentam a maior percentagem de recaídas comparativamente aos outros doentes genotipados para este polimorfismo (OR = 2,9; IC 95% = 1,23–6,9; $pvalue= 0,01$).

Tabela 4.10-Relação do número de doentes com e sem recaídas em função do seu genótipo para os SNP's MTHFR 677C>T e 1298A>C (adaptado de *D'Angelo* (288)).

Genótipo MTHFR	Número total de casos n=151	Número de doentes sem recaídas (%)	Número de doentes com recaídas (%)	Pvalue
677CC	48	32 (66,6)	16 (33,3)	0,008
677CT	71	55 (77,5)	16 (22,5)	
677TT	32	15 (46,8)	17 (53,1)	
1298AA	43	30 (69,7)	13 (30,2)	0,7
1298AC	83	54 (65)	29 (35)	
1298CC	25	18 (72)	7 (28)	

Ainda foi investigada a probabilidade de os doentes terem uma sobrevida livre da doença (DSF, do inglês *disease-free survival*) durante sete anos e uma sobrevida global (OS, do inglês *overall survival*). Observaram assim que os doentes portadores do genótipo 677TT têm uma DFS e OS menor que os doentes portadores do alelo 677C, como é possível visualizar na figura 4.6.

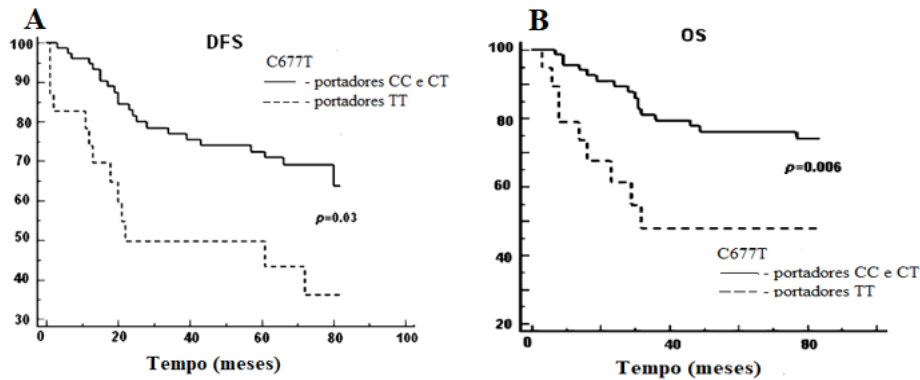


Figura 4.6- A-Análise por Kaplan–Meier das curvas de sobrevida livre de doença (DFS) durante 7 anos em função dos genótipos C677T. B- Análise por Kaplan–Meier das curvas de sobrevida global (OS) em função dos genótipos C677T (adaptado de *D’Angelo* (288)).

O estudo *Ongaro et.at.*(289), correlaciona a probabilidade de sobrevivência dos doentes que estão a fazer quimioterapia de manutenção com os seus genótipos para MTHFR 677C>T. Neste estudo verificou-se que os doentes portadores do genótipo 677TT tem uma probabilidade de sobrevivência menor ao longo do tempo, do que os doentes portadores do alelo 677 C (ver figura 4.7)

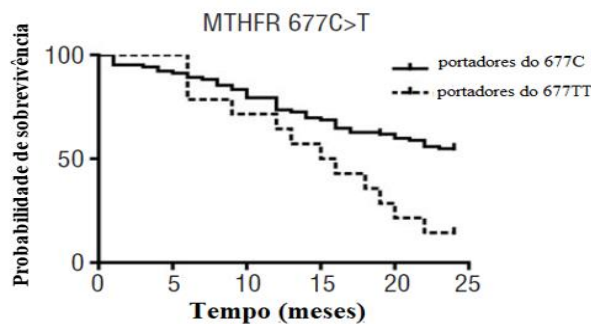


Figura 4.7-Análise por Kaplan-Meier das curvas de probabilidade de sobrevivência entre os doentes dependendo do seu genótipo para o MTHFR C677>T (adaptado de *Ongaro* (289)).

O estudo da eficácia clínica e da influência do SNP A1298>C têm ficado aquém das expectativas, uma vez que existe ainda contradição sobre a sua validade clínica, tendo sido considerada clinicamente importante apenas a influência na terapêutica do polimorfismo MTHFR C677>T (258).

4.4.3 Polimorfismos no gene da enzima TYMS

O mecanismo de atuação do MTX incluiu a inibição do enzima TYMS através das moléculas de MTX-pg. Esta inibição impede a síntese de DHF impossibilitando o normal funcionamento da via dos folatos e da via de síntese de nucleótidos pirimidínicos. Os polimorfismos nesta enzima têm sido estudados para que se correlacione a sua variabilidade genética com a resposta à terapêutica com o MTX, tanto em doentes com AR como em doentes com LLA (258,290).

Foi identificada uma região polimórfica na região 5' não-traduzida (5'-UTR). Esta região pode conter um número variado de repetições *tandem* (ou seja, lado a lado), (VNTR, do inglês *variable number tandem repeat*) de 28 pares de base (bp), sendo que os alelos mais frequentes são os de duas repetições (2R) e os de três repetições (3R), originando as variantes VNTR*2 e VNTR*3.

A variante VNTR*2 apresenta duas cópias da sequência de 28 bp, sendo que está presente uma “ACTT-box”. Já a VNTR*3 apresenta três cópias da sequência estando presentes duas “ACTT-box”. Estas “ACTT-box” são promotores de transcrição e como tal, é possível a ligação da maquinaria de transcrição do mRNA do enzima TYMS (ver figura 4.8). Portanto este polimorfismo parece atuar como um potenciador da expressão de mRNA e consequentemente alterar a atividade do enzima (275,291,292)

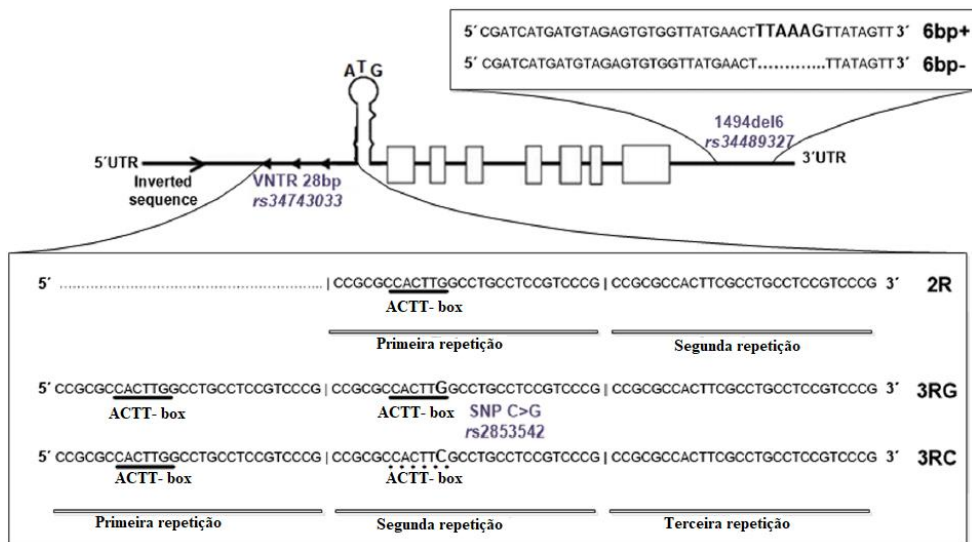


Figura 4.8-Figura esquemática do gene TYMS, onde é possível visualizar as diversas repetições das 28 bp (VNTR) e as “ACTT-box” (adaptado de Lima (292)).

De facto, comprovou-se que pacientes com o genótipo VNTR*3/VNTR*3 têm uma maior expressão do mRNA comparados com os pacientes com o genótipo VNTR*2/VNTR*2 (291,293). Foi encontrado um SNP de uma G por uma C agregado à segunda repetição

da variante VNTR*3, originando a variante VNTR*3C. Este SNP leva a uma alteração estrutural dos fatores de transcrição na segunda “ACTT-box” afetando assim a transcrição e diminuindo os níveis do enzima na célula (294). Este SNP em conjunto com as variantes VNTR formam o haplótipo TSER.

As implicações destes polimorfismos na resposta ao MTX nos doentes de AR ainda estão pouco evidenciadas, sendo que são necessários mais estudos que incidem nesta matéria. Contudo um estudo de Lima et.al. (292), analisou a resposta ao MTX em 233 pacientes de AR portugueses que são tratados com 15 mg de MTX por semana. Estes pacientes foram agrupados por grupos conforme a sua resposta ao fármaco, sendo que é considerado um paciente que não responde à terapêutica, quando após duas avaliações o seu índice DAS28 >3,2. Foram correlacionados os seus genótipos para o polimorfismo VNTR e para o TSER com a resposta ao MTX, sendo que os resultados estatisticamente válidos encontram-se na tabela 4.11.

Tabela 4.11-Relação do genótipo para o polimorfismo VNTR e haplótipo TSER com a resposta clínica ao fármaco (adaptado de Lima (292)).

Genótipo VNTR	% de pacientes que respondem	% de pacientes que não respondem	Pvalue	Odds Ratio
2R/2R	14,3	45,7		REFERÊNCIA
3R/3R	30,4	69,6	0,018	2,71
Portador do alelo 2R	50,6	49,4		REFERÊNCIA
3R/3R	30,4	69,6	0,005	2,34
Genótipo TSER	% de pacientes que respondem	% de pacientes que não respondem	Pvalue	Odds Ratio
2R/3RG	52,6	47,4		REFERÊNCIA
3RC/3RG	24,0	52,9	0,016	3,52
Portador do alelo 2R	51,3	48,7		REFERÊNCIA
Portador do alelo 3RC	56	95	0,008	1,79

Da análise da tabela pôde-se concluir que: os homozigotas 3R/3R apresentam um risco 2,71 vezes maior de não responder à terapêutica por comparação com os homozigotas 2R/2R; também os 3R/3R têm um risco mais elevado de não responderem

à terapêutica, por comparação aos portadores do alelo 2R (OR=2,34; *pvalue*=0,005) (292). Com isto, os autores concluíram que estes resultados estão de acordo com a literatura, visto que, com a variante VNTR 3R* ocorre uma maior transcrição do gene e uma maior concentração de TYMS nas células, levando a uma falha de terapêutica, pois existe maior concentração de DHF e o ciclo dos folatos não é inibido. Para que estes doentes obtenham uma resposta terapêutica eficaz, dever-se-á administrar uma dose maior de MTX em relação aos doentes com o genótipo 2R/2R (292).

Para o haplótipo TSER, apesar de que na literatura, as variantes VNTR 2R* e 3RC* conduziram a uma expressão semelhante da enzima. Quando comparada a resposta para o genótipo 3RC/3RG e para o genótipo 2R/3RG, verifica-se que é o genótipo 3RC/3RG que confere maior resistência ao MTX (OR=3,2. *pvalue*=0,016), revelando um “peso” diferente entre estes alelos na resposta dos doentes, não seguindo o que se observa *in vitro* (292).

Nos doentes de LLA este gene polimórfico pode ser determinante para os anos de EFS, ou seja, para os anos seguintes ao tratamento sem ter uma recaída ou morrer devido à doença. Assim *Krajinovic et al* (295), estudaram o impacto destes polimorfismos na população oncológica e concluíram que tal como na AR, os homozigotas 3R/3R apresentam uma eficácia na terapêutica com o MTX por comparação aos restantes genótipos, uma vez que, os homozigotas para a variante VNTR 3R* a apresentam uma menor EFS ao longo do tempo.

Como já descrito, a substituição de uma G por uma C poderá levar a uma menor expressão dos níveis de TYMS na variante 3RC* do que nas variantes VNTR 2R* e 3RG*. Estes investigadores também verificaram a veracidade desta hipótese, associando as três variantes (2R, 3RG, 3RC) com a probabilidade de EFS no mesmo grupo de doentes. Todos os genótipos da variante 3R* (3RC/3RC, 3RC/3RG e 3RG/3RG) estão em maioria no grupo dos doentes que apresentaram um evento. Após análise individual dos genótipos, verificou-se que apesar dos doentes com o genótipo 3RG/3RG apresentaram uma probabilidade mais baixa de EFS e pior eficácia no tratamento (*P*=0,003), os três subgrupos 3R contribuem todos para um risco maior de evento, não havendo uma diferença significativa entre eles (295). Concluíram também que, tal como para a AR, os portadores do genótipo 3RC/3RC não apresentam a mesma taxa de resposta ao MTX que os portadores do genótipo 2R/2R. Estes resultados não são concordantes

com ideologia teórica de que, estes genótipos seriam semelhantes ao nível da resposta (295).

Outro polimorfismo foi descoberto, no qual existe uma deleção de uma sequência de seis bp (TTAAAG) na região 3'UTR, onde se verificou que a presença desta deleção (variante 6bp⁻), promove uma diminuição da estabilidade do mRNA sintetizado e uma diminuição dos níveis de TYMS na célula. No estudo de Lima et.al. (292), comparou-se a resposta ao MTX com os genótipos presentes nos doentes de AR (6bp⁺/6bp⁺, 6bp⁺6bp⁻ e 6bp⁻/6bp⁻). Concluiu-se que, tendo como referência o genótipo 6bp⁺/6bp⁺, os portadores dos genótipos 6bp⁺6bp⁻ e 6bp⁻/6bp⁻, apresentam uma pior resposta, uma vez que estes pacientes estão presentes com grande frequência, 60,8% e 72,7% respetivamente, no grupo que não apresenta resposta à terapêutica. Os investigadores analisaram o efeito combinado dos três polimorfismos, originando seis haplótipos. Observou-se uma pior resposta nos pacientes portadores dos haplótipos 3RC6bp⁺, 3RC6bp⁻ e 3RG6bp⁻, pelo que poderá ser preciso uma maior dose nestes doentes (292).

Esta deleção foi também elucidada no artigo de *Krajinovic et.al* (295), que testaram os seus doentes, correlacionando cada haplótipo com a probabilidade de ter um evento. Assim os doentes foram divididos em seis haplótipos e investigou-se a presença e a ausência de eventos nestes haplótipos. Concluíram que ocorrem menos eventos nos doentes que são portadores do haplótipo 2R6bp⁻ enquanto que os doentes com o haplótipo 3RC6bp⁺ apresentam maior incidência de eventos (*pvalue*=0,04).

4.4.4 Polimorfismos no gene da enzima ATIC

Como já referido o enzima ATIC é inibido diretamente pelo MTX-pg, impedindo a degradação de adenosinas pelo enzima AICAR, levando assim a efeitos anti-inflamatórios.

Um dos polimorfismos encontrados nos doentes de AR é o SNP C347G no exão cinco (rs2372536). Este polimorfismo parece levar a uma diminuição da enzima ATIC e uma acumulação da AICAR potenciando a degradação da adenosina.

Num estudo com pacientes de AR caucasianos *Wessels et al.*(296), verificaram, após genotipagem, que 57% dos portadores do genótipo 347CC apresentam uma boa resposta clínica ao MTX (considerado no estudo como DAS28_{≤2,4}), enquanto que apenas 38% dos portadores do genótipo 347GG apresentam a mesma resposta clínica.

Noutro estudo com caucasianos foi possível verificar que este SNP não influencia apenas a resposta à medicação, mas também, influencia a intensidade dos efeitos adversos que os doentes sentem com este fármaco (297). Neste estudo *Grabar et.al.*(297), não verificaram uma associação significativa entre os portadores do alelo mutado e a eficácia da resposta. Contudo, chegaram foi à associação deste SNP com a ocorrência de efeitos adversos nos doentes que eram portadores do alelo G, ou seja, portadores dos genótipos 347CG e 347GG. Concluíram que estes doentes apresentam um risco maior de sofrerem toxicidade gastrointestinal, mielossupressão e problemas hepáticos ($pvalue=0,024$, $OR=2,497$, $IC\ 95\% 1,129 - 5,525$) (297,298). Este SNP está associado à falta de resposta do MTX em caucasianos, embora com pouco evidência clínica, não tendo sido verificado em pacientes asiáticos (299), existe portanto uma variabilidade racial neste gene que ainda não foi esclarecida (298).

Outro SNP foi estudado nos pacientes de AR, o SNP T675>C (rs4673993), o qual leva a uma provável alteração da atividade enzimática da ATIC e ao aumento da resposta por parte dos portadores do alelo C (300,301).

No estudo de Lima *et.al.*(283), foi correlacionado o efeito deste SNP com a resposta ao MTX. Num total de 233 pacientes com AR e com prescrição para 15 mg de MTX por semana, foram genotipados os doentes para o SNP675 e classificados conforme a sua resposta ao fármaco. Desta classificação verificaram que dos pacientes com genótipo 675CC (homozigotas para a variante) 70,8% alcançaram resposta terapêutica, enquanto que para o genótipo 675TT (homozigotas de referência) apenas 43,6% apresentaram resposta e 56,4% foram considerados resistentes ao MTX. Verificaram igualmente que, os portadores do alelo T (genótipo TC e TT) apresentam um risco acrescido ($OR=5,16$, $pvalue=0,013$) de não responderem à terapêutica do que os portadores do genótipo CC.

Com estes resultados, os autores apesar de afirmarem a falta de estudos sobre o que provocará este SNP no fenótipo do enzima, concluíram que ser portador do alelo mutado, poderá levar a uma diminuição da degradação da adenosina potenciando o seu efeito anti-inflamatório (283).

Num estudo de *Owen et.al.* (278), encontraram 4 SNPs associados à resposta do fármaco. Dois destes SNPs estão em desequilíbrio de ligação: rs12995526 T>C, e rs7563206 C>T, levando a uma ineficácia terapêutica nos portadores dos alelos mutados.

Outro SNP na região 5'UTR: rs16853834 C>T, que está associado com uma resposta fraca aos MTX e por fim o SNP rs3821353 G>T, no qual associaram os portadores do alelo mutado a uma resposta terapêutica mais eficaz.

Através do estudo de *Salazar et al.* (302), verificou-se que os SNPs rs16853826 G>A e rs10197559 C>T estão associados à incidência dos efeitos adversos do MTX.. Na figura 5.5 e 5.6 estão presentes as probabilidades do abandono da terapêutica por parte dos portadores dos vários genótipos destes SNP's.

Como é possível visualizar nas figuras seguintes, para o caso do SNP rs16853826 G>A os portadores do genótipo G/G apresentam uma probabilidade mais baixa de descontinuarem a terapêutica por sofrerem de efeitos adversos, isto quer dizer, que os doentes portadores do alelo mutado (A/G ou A/A) possuem uma incidência maior de efeitos adversos. Já para o SNP rs10197559 C>T o resultado é diferente, neste caso, os portadores do genótipo C/C incorrem numa probabilidade mais elevada de abandono da terapêutica e por consequente, uma maior incidência dos efeitos adversos (ver figura 4.9 e 4.10) (302).

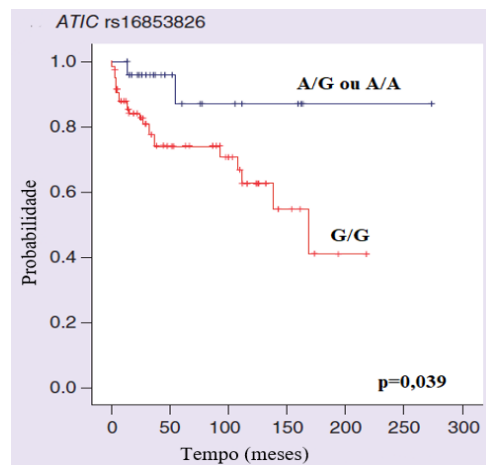


Figura 4.9-Probabilidade de descontinuação do MTX por toxicidade, conforme a variabilidade genética no SNP rs16853826 G>A (adaptado de *Salazar* (302)).

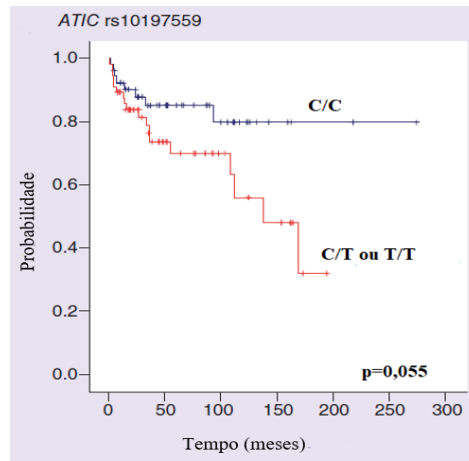


Figura 4.10-Probabilidade de descontinuação do MTX por toxicidade, conforme a variabilidade genética no SNP rs10197559 C>T (adaptado de Salazar (302)).

São vários os investigadores que se dedicam sobre a influência dos polimorfismos genéticos na resposta ao MTX, tanto na AR como no cancro, sendo que são encontradas diversas alterações que se manifestam de inúmeras maneiras. É ainda necessário trabalho investigacional na área de forma a consolidar quais os genes que poderiam ser genotipados para ocorrer uma terapêutica mais individualizada a cada doente.

5 Conclusão

A área da farmacogenómica está aceite como uma ferramenta de auxílio e apoio à prática clínica, pelo que é de total relevância a sua aplicação nas mais diversas patologias. Na AR não é ainda uma prática comum, pois a compreensão científica desta patologia é ainda pequena, sobretudo nos mecanismos fisiopatológicos que originam a doença.

Não obstante, tem-se vindo a acumular conhecimentos que se traduzem em mais valias terapêuticas, potenciando uma remissão da doença e aumentando os anos de vida com qualidade dos doentes. É nesta terapêutica que a farmacogenómica é importante, uma vez que, apesar de não potenciarem a cura, os diversos polimorfismos influenciam a resposta dos doentes. Esta influência nem sempre é benéfica, é verdade, mas como visto neste trabalho, existem vários polimorfismos que potenciam a resposta., levando a um aumento da percentagem de doentes que entram em remissão, pelo que e apesar de ainda pouco estudado, esta abordagem poderá fazer diferença no futuro destes doentes. Por outro lado, a identificação de polimorfismos que têm uma influência negativa na resposta pode ser também de utilidade, uma vez que podem identificar-se os doentes que poderiam ser poupados a estratégias de tentativa-e-erro (e eventual toxicidade) e utilizar nessas situações outras alternativas terapêuticas.

Dentro dos estudos já efetuados há ainda muita discrepância nos resultados, abrindo caminho a lacunas no conhecimento. Estas lacunas têm de ser preenchidas e para tal, é necessário replicar os estudos promissores, eliminando possíveis vieses como o número reduzido de doentes, desenhar outros estudos para que se abranja não só as enzimas apontadas neste trabalho, mas, outras possíveis candidatas.

Apesar deste trabalho ser dedicado à AR, houve recolha de informação científica dos mesmos polimorfismos para o cancro, de tal forma, foi possível comparar a resposta em patologias diferentes e acima de tudo em doses opostas. Chegou-se à conclusão que, apesar da resposta ser avaliada com parâmetros diferentes, variabilidade genética dos enzimas é muito semelhante entre as patologias e que a resposta normalmente, tende a ser equiparável.

Em suma, serve o presente trabalho como ferramenta de elucidação sobre o que já se demonstrou e o que falta demonstrar na doença, e na sua terapêutica. Sendo fulcral, uma maior incidência dos estudos na patologia em si, traduzindo-se posteriormente, em

estratégias terapêuticas eficazes e de preferência, ajustadas à variabilidade genética verificada entre os doentes.

6 Bibliografia

1. Seeley R. Anatomia e fisiologia. 8.^a ed. Lusociência; 2008.
2. Wright V, Dowson D, Kerr J. The structure of joints. 6.^a ed. 1973. 105-125 p.
3. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. Lancet. Fevereiro de 2009;373(9664):659–72.
4. Entezami P, Fox DA, Clapham PJ, Chung KC. Historical Perspective on the Etiology of Rheumatoid Arthritis. Hand Clin. Fevereiro de 2011;27(1):1–10.
5. Beauvais A. The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text os the doctoral dissertation presented in 1800. Jt Bone Spine. 2001;68:130–43.
6. Storey GD. Alfred Baring Garrod (1819–1907). Rheumatology. Outubro de 2001;40(10):1189–90.
7. Garrod AE. A treatise on rheumatism and rheumatoid arthritis. London Griffin. London, Griffin; 1980. 231-237 p.
8. Appelboom T. Hypothesis: Rubens--one of the first victims of an epidemic of rheumatoid arthritis that started in the 16th-17th century? Rheumatology. 22 de Fevereiro de 2005;44(5):681–3.
9. MATSUMOTO Y, UEMURA M, HIBINO N, YAMAMOTO M. Clinical usefulness of the 1987 revised criteria for rheumatoid arthritis by American Rheumatism Association. Nihon Naika Gakkai Zasshi. 1988;77(5):742–3.
10. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. Setembro de 2010;62(9):2569–81.
11. Mottram PL. Past, present and future drug treatment for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Immunol Cell Biol. Outubro de 2003;81(5):350–3.
12. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. Nat Rev Rheumatol. 27 de Outubro de 2016;12(12):731–42.
13. Sokka T. Increases in use of methotrexate since the 1980s. Clin Exp Rheumatol.

- 2010;28(5 Suppl 61):S13-20.
14. Amgen F. Cross discipline team leader review: denosumab. *Cent Drug Eval Res.* 2010;
 15. Gaujoux-Viala C, Nam J, Ramiro S, Landewé R, Buch MH, Smolen JS, et al. Efficacy of conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs, glucocorticoids and tofacitinib: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* Março de 2014;73(3):510–5.
 16. WHO | Chronic rheumatic conditions. WHO. 2016 [citado 26 de Abril de 2017]; Disponível em: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>
 17. van den Hoek J, Boshuizen HC, Roorda LD, Tjhuis GJ, Nurmohamed MT, van den Bos GAM, et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study. *Rheumatol Int.* 28 de Abril de 2017;37(4):487–93.
 18. Lacaille D, Avina-Zubieta JA, Sayre EC, Abrahamowicz M. Improvement in 5-year mortality in incident rheumatoid arthritis compared with the general population—closing the mortality gap. *Ann Rheum Dis.* Junho de 2017;76(6):1057–63.
 19. Alamanos Y, Voulgari P V., Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* Dezembro de 2006;36(3):182–8.
 20. Costa L. Prevalência auto-declarada de doenças reumáticas numa população urbana. *Acta Reum Port.* 2004;29:169–74.
 21. Monjardino T, Lucas R, Barros H. Frequency of rheumatic diseases in portugal: a systematic review. *Acta Reum Port.* 2011;36:336–63.
 22. Cardarelli WJ. Implications for managed care and specialty pharmacy in rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care.* Dezembro de 2012;18(13 Suppl):S315-24.
 23. Kavanaugh A. Economic consequences of established rheumatoid arthritis and its treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* Outubro de 2007;21(5):929–42.

24. Miranda LC, Santos H, Ferreira J, Coelho P, Silva C, Saraiva-Ribeiro J, et al. Finding Rheumatoid Arthritis Impact on Life (FRAIL Study): economic burden. *Acta Reumatol Port.* 2012;37(2):134–42.
25. Birch JT, Bhattacharya S. Emerging Trends in Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Prim Care Clin Off Pract.* Dezembro de 2010;37(4):779–92.
26. June RR, Moreland LW. Andreoli and Carpenter's - Cecil essentials of medicine. 9.^a ed. Benjamin IJ, Griggs RC, Wing EJ, Fitz JG, editores. 2016. 770-774 p.
27. Vaz Lopes A. Artrite Reumatóide. Lidel; 2000.
28. Kasper D, Hauser SL, Fauci AS, Longo DL, Jameson L, Loscalzo J. Harrison's- Principles of Internal Medicine. 19.^a ed. 2136-2149 p.
29. Cutolo M, Kitas GD, van Riel PLCM. Burden of disease in treated rheumatoid arthritis patients: Going beyond the joint. *Semin Arthritis Rheum.* Fevereiro de 2014;43(4):479–88.
30. Nyhäll-Wåhlin B-M, Turesson C, Jacobsson L, Nilsson J-Å, Forslind K, Albertsson K, et al. The presence of rheumatoid nodules at early rheumatoid arthritis diagnosis is a sign of extra-articular disease and predicts radiographic progression of joint destruction over 5 years. *Scand J Rheumatol.* 5 de Março de 2011;40(2):81–7.
31. Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun Rev.* Dezembro de 2011;11(2):123–31.
32. Yunt ZX, Solomon JJ. Lung disease in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* Maio de 2015;41(2):225–36. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4415514>
33. Allan JS, Donahue DM, Garrity JM. Rheumatoid Pleural Effusion in the Absence of Arthritic Disease. *Ann Thorac Surg.* Outubro de 2005;80(4):1519–21.
34. Emmungil H, Yıldız F, Gözükar MY, Açıkalin A. Rheumatoid pleural effusion with nodular pleuritis. *Z Rheumatol.* 7 de Fevereiro de 2015;74(1):72–4.
35. Fonseca João, Canhão Helena QM. Reumatologia fundamental. Lidel. 2016. 45-

51 p.

36. Gabay C, Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. Epstein FH, editor. N Engl J Med. 11 de Fevereiro de 1999;340(6):448–54.
37. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. N Engl J Med. 8 de Dezembro de 2011;365(23):2205–19.
38. Dourado M. Fisiopatologia - Fundamentos e aplicações. 2ª. Lidel; 2013. 219-232 p.
39. Cardoso A, Branco J, Silva JA, Cruz M, Costa M. Regras de ouro- Reumatologia. Lisboa; 2005 [citado 4 de Abril de 2017]. Disponível em: <http://www.dgs.pt>
40. Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Arthritis Care Res (Hoboken). Janeiro de 2016;68(1):1–25.
41. Mohan C, Assassi S. Biomarkers in rheumatic diseases: how can they facilitate diagnosis and assessment of disease activity? BMJ. 26 de Novembro de 2015;h5079.
42. Kay J, Morgacheva O, Messing SP, Kremer JM, Greenberg JD, Reed GW, et al. Clinical disease activity and acute phase reactant levels are discordant among patients with active rheumatoid arthritis: acute phase reactant levels contribute separately to predicting outcome at one year. Arthritis Res Ther. 2014;16(1):R40.
43. Conigliaro P, Chimenti MS, Triggianese P, Sunzini F, Novelli L, Perricone C, et al. Autoantibodies in inflammatory arthritis. Autoimmun Rev. Julho de 2016;15(7):673–83.
44. Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. QJM. 1 de Março de 2010;103(3):139–46.
45. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. Outubro de 2003;48(10):2741–9.

46. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmström V, Feldmann M, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* Janeiro de 2010;233(1):34–54.
47. Verheul MK, Fearon U, Trouw LA, Veale DJ. Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. *Clin Immunol.* Novembro de 2015;161(1):2–10.
48. LUBAN S, LI Z-G. Citrullinated peptide and its relevance to rheumatoid arthritis: an update. *Int J Rheum Dis.* Outubro de 2010;13(4):284–7.
49. SUZUKI A, YAMADA R, YAMAMOTO K. Citrullination by Peptidylarginine Deiminase in Rheumatoid Arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1 de Junho de 2007;1108(1):323–39.
50. van Venrooij WJ, van Beers JJBC, Pruijn GJM. Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* Novembro de 2008;1143(1):268–85.
51. Fransen J, van Riel PLCM. The Disease Activity Score and the EULAR Response Criteria. *Rheum Dis Clin North Am.* Novembro de 2009;35(4):745–57.
52. Felson David T.; Pincus T. ACR20/50/70 - American College of Rheumatology 20/50/70 criteria. [citado 17 de Agosto de 2017]. Disponível em: <https://eprovide.mapi-trust.org/instruments/american-college-of-rheumatology-20-50-70-criteria>
53. Tracy A, Buckley CD, Raza K. Pre-symptomatic autoimmunity in rheumatoid arthritis: when does the disease start? *Semin Immunopathol.* 23 de Junho de 2017;39(4):423–35.
54. Kurkó J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of Rheumatoid Arthritis — A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 5 de Outubro de 2013;45(2):170–9.
55. Yarwood A, Huizinga TWJ, Worthington J. The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA: Table 1. *Rheumatology.* Fevereiro de 2016;55(2):199–209.
56. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* Dezembro de

- 2004;5(12):889–99.
57. Punt Jenni, Owen Judy SS. *Immunology*. 7.^a ed. 2013.
 58. Castro- Santos P, Díaz- Peña R. Genética da artrite reumatoide: é necessário um novo impulso em populações latino- americanas. *Rev Bras Reumatol*. Março de 2016;56(2):171–7.
 59. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Blanco F. Gene Polymorphisms and Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis. *Curr Genomics*. 1 de Setembro de 2008;9(6):381–93.
 60. Stastny P. Association of the B-Cell Alloantigen DRw4 with Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 20 de Abril de 1978;298(16):869–71.
 61. HLA-DRB1 - MHC class II HLA-DR4/Dw14 - Homo sapiens (Human) - HLA-DRB1 gene. [citado 5 de Junho de 2017]. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q30156>
 62. Wordsworth P, Pile KD, Buckely JD, Lanchbury JS, Ollier B, Lathrop M, et al. HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. Setembro de 1992;51(3):585–91.
 63. Jawaheer D, Thomson W, Macgregor AJ, Carthy D, Davidson J, Dyer PA, et al. «Homozygosity» for the HLA–DR shared epitope contributes the highest risk for rheumatoid arthritis concordance in identical twins. *Arthritis Rheum*. Maio de 1994;37(5):681–6.
 64. FATHMAN CG, GORONZY J, WEYAND C. Gene Conversion A Mechanism to Explain HLA-D Region and Disease Association. *Ann N Y Acad Sci*. Julho de 1986;475(1 Autoimmunity):24–31.
 65. Vaughan RW. PCR-SSO typing for HLA-DRB alleles. *Eur J Immunogenet*. 1991;18(1–2):69–80. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1676912>
 66. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee H, Jia X, et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 29 de Janeiro de 2012;44(3):291–6.

67. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol*. 21 de Agosto de 2012;8(10):573–86.
68. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):205.
69. van der Helm-van Mil AHM, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TWJ, Toes REM, de Vries RRP. The HLA–DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti–cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. Abril de 2006;54(4):1117–21.
70. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TWJ, Schreuder GMT, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. Julho de 2004;50(7):2113–21.
71. Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, et al. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis*. 1 de Maio de 2009;68(5):736–43.
72. Ding B, Padyukov L, Lundström E, Seielstad M, Plenge RM, Oksenberg JR, et al. Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum*. Janeiro de 2009;60(1):30–8.
73. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*. 7 de Abril de 2004;36(4):337–8.
74. Vang T, Miletic A V., Arimura Y, Tautz L, Rickert RC, Mustelin T. Protein Tyrosine Phosphatases in Autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. Abril de 2008;26(1):29–55.
75. Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene

- Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis. *Am J Hum Genet.* Agosto de 2004;75(2):330–7.
76. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(5):290–5.
 77. Vang T, Liu WH, Delacroix L, Wu S, Vasile S, Dahl R, et al. LYP inhibits T-cell activation when dissociated from CSK. *Nat Chem Biol.* 2012;8(5):437–46.
 78. Farago B, Talian GC, Komlosi K, Nagy G, Berki T, Gyetvai A, et al. Protein tyrosine phosphatase gene C1858T allele confers risk for rheumatoid arthritis in Hungarian subjects. *Rheumatol Int.* 2009;29(7):793–6.
 79. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett.* 1 de Dezembro de 2011;585(23):3689–98.
 80. Goëb V, Dieudé P, Daveau R, Thomas-L’Otellier M, Jouen F, Hau F, et al. Contribution of PTPN22 1858T, TNFR2 196R and HLA-shared epitope alleles with rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies to very early rheumatoid arthritis diagnosis. *Rheumatology.* 2008;47(8):1208–12.
 81. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet.* 2005;37(12):1317–9.
 82. Harrison P, Pointon JJ, Farrar C, Brown MA, Wordsworth BP. Effects of PTPN22 C1858T polymorphism on susceptibility and clinical characteristics of British Caucasian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology.* 2006;45(8):1009–11.
 83. Van Oene M, Wintle RF, Liu X, Yazdanpanah M, Gu X, Newman B, et al. Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn’s disease, in Canadian populations. *Arthritis Rheum.* 2005;52(7):1993–8.
 84. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411–52.
 85. Verweij CL. Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in

- rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. Novembro de 1999;58(Suppl 1):I20–6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1766583>
86. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* [Internet]. 1 de Fevereiro de 1993;177(2):557–60. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8426126>
87. Stojanovic S, Bojana Stamenkovic, Stoimenov TJ, Nedovic J, Zivkovic V, Despotovic M, et al. Association of tumor necrosis factor- α (G-308A) genetic variant with matrix metalloproteinase-9 activity and joint destruction in early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 1 de Julho de 2017;36(7):1479–85.
88. Udalova IA, Richardson A, Denys A, Smith C, Ackerman H, Foxwell B, et al. Functional Consequences of a Polymorphism Affecting NF-kappa B p50-p50 Binding to the TNF Promoter Region. *Mol Cell Biol*. 15 de Dezembro de 2000;20(24):9113–9.
89. van Krugten M V., Huizinga TWJ, Kaijzel EL, Zanelli E, Drossaers-Bakker KW, van de Linde P, et al. Association of the TNF +489 polymorphism with susceptibility and radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. Novembro de 1999;1(2):91–6.
90. Kaijzel EL, van Krugten M V, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, et al. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med*. Novembro de 1998;4(11):724–33.
91. Kurreeman F a S, Goulielmos GN, Alizadeh BZ, Rueda B, Houwing-Duistermaat J, Sanchez E, et al. The TRAF1-C5 region on chromosome 9q33 is associated with multiple autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*. 1 de Abril de 2010;69(4):696–9.
92. Zhu J, Zhang D, Wu F, He F, Liu X, Wu L, et al. Single nucleotide polymorphisms at the TRAF1/C5 locus are associated with rheumatoid arthritis in a Han Chinese population. *BMC Med Genet*. 14 de Dezembro de 2011;12(1):53.
93. SNPedia-rs3761847. [citado 3 de Julho de 2017]. Disponível em: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs3761847>

94. Han T-U, Bang S-Y, Kang C, Bae S-C. TRAF1 polymorphisms associated with rheumatoid arthritis susceptibility in Asians and in Caucasians. *Arthritis Rheum.* Setembro de 2009;60(9):2577–84.
95. Poór G, Nagy Z, Schmidt Z, Brózik M, Merétey K, Gergely P. Genetic background of anticyclic citrullinated peptide autoantibody production in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1110(1):23–32.
96. Iwamoto T, Ikari K, Nakamura T, Kuwahara M, Toyama Y, Tomatsu T, et al. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Rheumatology.* 2006;45(7):804–7.
97. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2003;10(7):520–7.
98. Hoppe B, Häupl T, Gruber R, Kiesewetter H, Burmester GR, Salama A, et al. Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2).
99. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet.* 2005;77(6):1044–60.
100. Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum.* Abril de 2004;50(4):1117–21.
101. Abd-Allah SH, El-Shal AS, Shalaby SM, Pasha HF, El-Saoud AMA, El-Najjar AR, et al. PADI4 polymorphisms and related haplotype in rheumatoid arthritis patients. *Jt Bone Spine.* 2012;79(2):124–8.
102. Faragó B, Talián GC, Maász A, Magyari L, Horvatovich K, Kovács B, et al. Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: No influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol.*

- 2007;25(4):523–8.
103. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 6 de Setembro de 2007;357(10):977–86.
 104. Ji JD, Lee WJ, Kong KA, Woo JH, Choi SJ, Lee YH, et al. Association of STAT4 polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 29 de Janeiro de 2010;37(1):141–7.
 105. Martínez A, Varadé J, Márquez A, Cénit MC, Espino L, Perdigonés N, et al. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. *Arthritis Rheum.* Setembro de 2008;58(9):2598–602.
 106. Klareskog L, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol.* Janeiro de 2007;19(1):49–54.
 107. Bang S-Y, Lee K-H, Cho S-K, Lee H-S, Lee KW, Bae S-C. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of RF and ACPA. *Arthritis Rheum.* 2010;62(2):NA-NA.
 108. van der Woude D, Alemaeyhu WG, Verduijn W, de Vries RRP, Houwing-Duistermaat JJ, Huizinga TWJ, et al. Gene-environment interaction influences the reactivity of autoantibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* Outubro de 2010;42(10):814–6.
 109. Lee H-S, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, et al. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: A mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum.* Junho de 2007;56(6):1745–53.
 110. Linn-Rasker SP. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis.* 1 de Março de 2006;65(3):366–71.
 111. Klareskog L, Padyukov L, Lorentzen J, Alfredsson L. Mechanisms of Disease: genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* Agosto de 2006;2(8):425–33.
 112. Kallberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Ronnelid J, Klareskog L, et al.

- Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis.* 1 de Março de 2011;70(3):508–11.
113. Petrini C. From bench to bedside and to health policies: ethics in translational research. *Clin Ter.* 2011;162(1):51–9.
 114. Cutolo M. Androgens in rheumatoid arthritis: when are they effectors? *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):126.
 115. Silman AJ, Pearson JE. No Title. *Arthritis Res.* 2002;4(Suppl 3):S265.
 116. König MF, Paracha AS, Moni M, Bingham CO, Andrade F. Defining the role of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid arthritis through the study of PPAD biology. *Ann Rheum Dis.* Novembro de 2015;74(11):2054–61.
 117. Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 23 de Agosto de 2011;7(10):569–78.
 118. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* Julho de 2012;51 Suppl 5(suppl 5):v3-11.
 119. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* Junho de 2007;7(6):429–42.
 120. Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):29–37.
 121. Gaafar T, Farid R, Raafat H, Bayoumi F, Rasheed BG and D. The TH17/Treg Imbalance in Rheumatoid Arthritis and Relation to Disease Activity. *J Clin Cell Immunol.* 2015;6(6). Disponível em: <http://www.omicsonline.org/open-access/the-th17treg-imbalance-in-rheumatoid-arthritis-and-relation-to-disease-activity-2155-9899-1000381.php?aid=66292>
 122. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care.* Dezembro de 2012;18(13 Suppl):S295-302.

123. Marston B, Palanichamy A, Anolik JH. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. Maio de 2010;22(3):307–15.
124. Kotake S, Yago T, Kobashigawa T, Nanke Y. The Plasticity of Th17 Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med*. 2017;6(7):67. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2077-0383/6/7/67>
125. Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(1):29. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1064899&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
126. Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4+ T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 19 de Novembro de 2015;6(NOV):1–19.
127. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. Junho de 2007;7(6):429–42.
128. Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, Guma M. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):110. Disponível em: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-017-1303-3>
129. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*. 2005;115(3):622–31.
130. Sabeh F, Fox D, Weiss SJ. Membrane-Type I Matrix Metalloproteinase-Dependent Regulation of Rheumatoid Arthritis Synoviocyte Function. *J Immunol*. 1 de Junho de 2010;184(11):6396–406.
131. Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester G-R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2007;9(6):224. Disponível em: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2333>
132. Okamoto K, Takayanagi H. Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *Int Immunopharmacol*. Maio de 2011;11(5):543–8.

133. Komatsu N, Takayanagi H. Autoimmune Arthritis. Em: *Advances in Immunology*. 1.^a ed. Elsevier Inc.; 2012. p. 45–71. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394299-9.00002-3>
134. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* [. 2007;9(Suppl 1):S1. Disponível em: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2165>
135. Bykerk VP, Massarotti EM. The new ACR/EULAR remission criteria: rationale for developing new criteria for remission. *Rheumatology*. 1 de Dezembro de 2012;51(suppl 6):vi16-vi20.
136. Smyth EM, FitzGerald G a. *Basical and clinical pharmacology*. 12.^a ed. Basic and clinical Pharmacology. 2012.
137. Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum*. Dezembro de 2003;33(3):155–67.
138. Crofford LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2013;15 Suppl 3(Suppl 3):S2. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3891482>
139. Edwards JE, McQuay HJ, Moore AR. Efficacy and safety of valdecoxib for treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review of randomised controlled trials. *Pain*. Outubro de 2004;111(3):286–96.
140. Garner SE, Fidan D, Frankish RR, Maxwell L. Rofecoxib for osteoarthritis. Em: Garner SE, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2005. p. CD005115.
141. Mathew ST, Devi S G, Prasanth V V., Vinod B. Efficacy and Safety of COX-2 Inhibitors in the Clinical Management of Arthritis: Mini Review. *ISRN Pharmacol*. 2011;2011:480291.
142. Emery P, Zeidler H, Kvien TK, Guslandi M, Naudin R, Stead H, et al. Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomised double-blind comparison. *Lancet*. Dezembro de 1999;354(9196):2106–11.
143. Varga Z, Sabzwari SRA, Vargova V. Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Under-Recognized Public Health Issue. *Cureus*. 8 de

Abril de 2017;9(4):e1144.

144. Deeks JJ, Smith LA, Bradley MD. Efficacy, tolerability, and upper gastrointestinal safety of celecoxib for treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review of randomised controlled trials. *BMJ*. 21 de Setembro de 2002;325(7365):619.
145. Lanas A, García-Rodríguez LA, Arroyo MT, Gomollón F, Feu F, González-Pérez A, et al. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut*. Dezembro de 2006;55(12):1731–8.
146. Shih S-C, Chang C-W. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-related Gastrointestinal Bleeding in the Elderly. *Int J Gerontol*. Março de 2007;1(1):40–5.
147. Lindhardsen J, Gislason GH, Jacobsen S, Ahlehoff O, Olsen A-MS, Ole Rintek Madsen, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis*. Agosto de 2014;73(8):1515–21.
148. Mukherjee D. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochem Pharmacol*. 1 de Março de 2002;63(5):817–21.
149. Nissen SE, Yeomans ND, Solomon DH, Lüscher TF, Libby P, Husni ME, et al. Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. *N Engl J Med*. 2016;375(26):2519–29.
150. Lee SJ-A, Kavanaugh A. Pharmacological treatment of established rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. Outubro de 2003;17(5):811–29.
151. van der Goes MC, Jacobs JW, Bijlsma JW. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases - positive and adverse effects. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(Suppl 2):S2.
152. Rau R. Glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Pharmacother*. 26 de Agosto de 2014;15(11):1575–83.
153. van Everdingen AA, Jacobs JW, Siewertsz Van Reesema DR, Bijlsma JWJ. Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis:

- clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann Intern Med.* 1 de Janeiro de 2002;136(1):1–12.
154. Schaaf MJ., Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Dezembro de 2002;83(1–5):37–48.
 155. Yao XL, Cowan MJ, Gladwin MT, Lawrence MM, Angus CW, Shelhamer JH. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity. *J Biol Chem.* 11 de Junho de 1999;274(24):17202–8.
 156. Schaaf MJM, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Dezembro de 2002;83(1–5):37–48.
 157. Criswell L, Saag K, Sems KM, Welch V, Shea B, Wells GA, et al. Moderate-term, low-dose corticosteroids for rheumatoid arthritis. Em: Criswell L, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1998. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001158>
 158. Gotzsche PC, Johansen HK. Short-term low-dose corticosteroids vs placebo and nonsteroidal antiinflammatory drugs in rheumatoid arthritis. *Cochrane database Syst Rev.* 2004;(3):CD000189.
 159. Buttgerit F, Doering G, Schaeffler A, Witte S, Sierakowski S, Gromnica-Ihle E, et al. Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* Janeiro de 2008;371(9608):205–14.
 160. Kirwan JR, Bijlsma JW, Boers M, Shea B. Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. Em: Kirwan JR, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 2007–10.
 161. Kavanaugh A, Wells AF. Benefits and risks of low-dose glucocorticoid treatment in the patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 1 de Outubro de 2014;53(10):1742–51.
 162. Choy EHS, Smith CM, Farewell V, Walker D, Hassell A, Chau L, et al. Factorial

- randomised controlled trial of glucocorticoids and combination disease modifying drugs in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 17 de Agosto de 2007;67(5):656–63.
163. Engvall I-L, Svensson B, Boonen A, van der Heijde D, Lerner UH, Hafstrom I. Low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis inhibits collagen type I degradation by matrix metalloproteinases as assessed by serum 1CTP--a possible mechanism for specific inhibition of radiological destruction. *Rheumatology.* 1 de Abril de 2013;52(4):733–42.
 164. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis.* Março de 2014;73(3):492–509.
 165. RANGANATHAN P, McLEOD H. Race and Methotrexate Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 1 de Maio de 2010;37(5):1064–1064.
 166. Yadlapati S, Efthimiou P. Inadequate response or intolerability to oral methotrexate: Is it optimal to switch to subcutaneous methotrexate prior to considering therapy with biologics? *Rheumatol Int.* 2 de Maio de 2016;36(5):627–33.
 167. Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J Clin Invest.* 15 de Julho de 1998;102(2):322–8.
 168. Kremer JM, Phelps CT. Long-Term Prospective Study of the Use of Methotrexate in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* Fevereiro de 1992;35(2):138–45.
 169. Braun J, Kästner P, Flaxenberg P, Währisch J, Hanke P, Demary W, et al. Comparison of the clinical efficacy and safety of subcutaneous versus oral administration of methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a six-month, multicenter, randomized, double-blind, controlled, phase IV trial. *Arthritis Rheum.* Janeiro de 2008;58(1):73–81.
 170. Cipriani P, Ruscitti P, Carubbi F, Liakouli V, Giacomelli R. Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: Optimizing Therapy Among Different Formulations.

- Current and Emerging Paradigms. *Clin Ther.* Março de 2014;36(3):427–35.
171. Schiff MH, Jaffe JS, Freundlich B. Head-to-head, randomised, crossover study of oral versus subcutaneous methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: drug-exposure limitations of oral methotrexate at doses ≥ 15 mg may be overcome with subcutaneous administration. *Ann Rheum Dis.* Agosto de 2014;73(8):1549–51.
 172. Fleischmann R, Schiff M, van der Heijde D, Ramos-Remus C, Spindler A, Stanislav M, et al. Baricitinib, Methotrexate, or Combination in Patients With Rheumatoid Arthritis and No or Limited Prior Disease-Modifying Antirheumatic Drug Treatment. *Arthritis Rheumatol.* Março de 2017;69(3):506–17.
 173. Kuriya B, Arkema E V, Bykerk VP, Keystone EC. Efficacy of initial methotrexate monotherapy versus combination therapy with a biological agent in early rheumatoid arthritis: a meta-analysis of clinical and radiographic remission. *Ann Rheum Dis.* 1 de Julho de 2010;69(7):1298–304.
 174. Desmoulin SK, Hou Z, Gangjee A, Matherly LH. The human proton-coupled folate transporter. *Cancer Biol Ther.* 6 de Dezembro de 2012;13(14):1355–73.
 175. Gorlick R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR. Intrinsic and Acquired Resistance to Methotrexate in Acute Leukemia. Wood AJJ, editor. *N Engl J Med.* 3 de Outubro de 1996;335(14):1041–8.
 176. Zhu H, Deng F-Y, Mo X-B, Qiu Y-H, Lei S-F. Pharmacogenetics and pharmacogenomics for rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate treatment: the 2013 update. *Pharmacogenomics.* Março de 2014;15(4):551–66.
 177. Mikkelsen Torben S, Thorn Caroline F, Yang Jun J, Ulrich Cornelia M, French Deborah, Zaza Gianluigi, Dunnenberger Henry M, Marsh Sharon, McLeod Howard L, Giacomini Kathy, Becker Mara L, Gaedigk Roger, Leeder James Steven, Kager Leo, Relling Mary V, Evans ARB. PharmGKB summary: methotrexate pathway- Pharmacogenetics and genomics. 2011 [citado 9 de Agosto de 2017]. Disponível em: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2039>
 178. Silva MA, Klafke JZ, Rossato MF, Gewehr C, Guerra GP, Rubin MA, et al. Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain. *Biochem Pharmacol.* Agosto de 2011;82(3):269–77.

179. Chan ESL, Cronstein BN. Methotrexate—how does it really work? *Nat Rev Rheumatol*. Março de 2010;6(3):175–8.
180. Peters LJ, Olsen NJ. Mechanisms of action of methotrexate. *Bull Rheum Dis*. Outubro de 1991;41(6):5–8.
181. Haskó G, Cronstein B. Regulation of Inflammation by Adenosine. *Front Immunol*. 2013;4(APR):1–8.
182. Riksen NP, Barrera P, van den Broek PHH, van Riel PLCM, Smits P, Rongen GA. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Ann Rheum Dis*. 1 de Abril de 2006;65(4):465–70.
183. Griffiths H LG. Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: Efficacy and Safety. *J Pharmacovigil*. 2014;2(2):8–11.
184. Shea B, Swinden M V, Tanjong Ghogomu E, Ortiz Z, Katchamart W, Rader T, et al. Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. Em: Shea B, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD000951.pub2>
185. Endresen GK, Husby G. Folate supplementation during methotrexate treatment of patients with rheumatoid arthritis. An update and proposals for guidelines. *Scand J Rheumatol*. 2001;30(3):129–34.
186. Stenger AA, Houtman PM, Bruyn GA. Does folate supplementation make sense in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate? *Ann Rheum Dis*. Agosto de 1992;51(8):1019–20.
187. Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y WD. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res*. 2014. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00795#pharmacology>
188. Cutolo M, Bolosiu H, Perdriset G. Efficacy and safety of leflunomide in DMARD-naive patients with early rheumatoid arthritis: comparison of a loading and a fixed-dose regimen. *Rheumatology*. 1 de Junho de 2013;52(6):1132–40.

189. Li EK, Tam L, Tomlinson B. Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Ther.* Abril de 2004;26(4):447–59.
190. Sharp JT, Strand V, Leung H, Hurley F, Loew-Friedrich I. Treatment with leflunomide slows radiographic progression of rheumatoid arthritis: Results from three randomized controlled trials of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Março de 2000;43(3):495.
191. Cohen S, Cannon G, Schiff M. Two- year, blinded, randomized, controlled trial of treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):1984–92.
192. Kellner H, Bornholdt K, Hein G. Leflunomide in the treatment of patients with early rheumatoid arthritis—results of a prospective non-interventional study. *Clin Rheumatol.* 23 de Agosto de 2010;29(8):913–20.
193. Cannon GW, Kremer JM. Leflunomide. *Rheum Dis Clin North Am.* Maio de 2004;30(2):295–309.
194. Dayer JM, Cutolo M. Is there a rationale to using leflunomide in early rheumatoid arthritis? *Clin Exp Rheumatol* [Internet]. 2005;23(3):404–12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15971434>
195. Emery P, Breedveld FC, Lemmel EM, Kaltwasser JP, Dawes PT, Gömör B, et al. A comparison of the efficacy and safety of leflunomide and methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* Junho de 2000;39(6):655–65.
196. Makol A, Krause M. Management of rheumatoid arthritis during pregnancy: challenges and solutions. *Open Access Rheumatol Res Rev.* Março de 2016;8:23.
197. Gaffo A, Saag KG, Curtis JR. Treatment of rheumatoid arthritis. *Am J Heal Pharm.* 15 de Dezembro de 2006;63(24):2451–65.
198. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet.* Junho de 2017;389(10086):2338–48.
199. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis.*

- 1 de Junho de 2010;69(6):964–75.
200. van Rossum MAJ, Fiselier TJW, Franssen MJAM, Zwinderman AH, ten Cate R, van Suijlekom-Smit LWA, et al. Sulfasalazine in the treatment of juvenile chronic arthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Arthritis Rheum.* Maio de 1998;41(5):808–16.
 201. Pullar T, Hunter JA, Capell HA. Sulphasalazine in rheumatoid arthritis: a double blind comparison of sulphasalazine with placebo and sodium aurothiomalate. *BMJ.* 15 de Outubro de 1983;287(6399):1102–4.
 202. Hannonen P, Möttönen T, Hakola M, Oka M. Sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. A 48-week double-blind, prospective, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum.* Novembro de 1993;36(11):1501–9.
 203. Ogrendik M. Antibiotics for the treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Gen Med.* Dezembro de 2013;43.
 204. Cildag S, Senturk T. Sulfasalazine-Related Hypersensitivity Reactions in Patients With Rheumatic Diseases. *JCR J Clin Rheumatol.* Março de 2017;23(2):77–9.
 205. Narayan N, Rigby S, Carlucci F. Sulfasalazine induced immune thrombocytopenia in a patient with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 24 de Fevereiro de 2017;36(2):477–9.
 206. Kim SC, Hernandez-Diaz S. Safety of Immunosuppressive Drugs in Pregnant Women With Systemic Inflammatory Diseases. *Arthritis Rheumatol.* Fevereiro de 2014;66(2):246–9.
 207. Feely MG, O’Dell JR. Update on the use of conventional disease-modifying antirheumatic drugs in the management of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* Maio de 2010;22(3):316–20.
 208. Danza Á, Graña D, Goñi M, Vargas A, Ruiz-Irastorza G. Hidroxicloroquina en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes sistémicas. *Rev Med Chil.* Fevereiro de 2016;144(2):232–40.
 209. Jessop JD, O’Sullivan MM, Lewis P a, Williams L a, Camilleri JP, Plant MJ, et al. A long-term five-year randomized controlled trial of hydroxychloroquine, sodium aurothiomalate, auranofin and penicillamine in the treatment of patients with

- rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* [. Setembro de 1998;37(9):992–1002.
210. Gibofsky A. Combination Therapy for Rheumatoid Arthritis in the Era of Biologicals. *HSS J.* 1 de Fevereiro de 2006;2(1):30–41.
 211. O’Dell JR, Haire CE, Erikson N, Drymalski W, Palmer W, Eckhoff PJ, et al. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Methotrexate Alone, Sulfasalazine and Hydroxychloroquine, or a Combination of All Three Medications. *N Engl J Med.* 16 de Maio de 1996;334(20):1287–91.
 212. Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology.* 6 de Outubro de 2015;23(5):231–69.
 213. Rynes RI. Ophthalmologic safety of long-term hydroxychloroquine sulfate treatment. *Am J Med.* 18 de Julho de 1983;75(1A):35–9.
 214. Marmor MF, Kellner U, Lai TYY, Melles RB, Mieler WF. Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology.* Junho de 2016;123(6):1386–94.
 215. Jung YO, Kim HA. Recent Paradigm Shifts in the Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Korean J Intern Med.* 2012;27(4):378.
 216. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci.* 15 de Outubro de 1992;89(20):9784–8.
 217. Maini RN, Feldmann M. How does infliximab work in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 2(Suppl 2):S22-8.
 218. Perdriger A. Infliximab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biologics.* 2009;3(2):183–91.
 219. Meroni P-L, Valesini G. Tumour Necrosis Factor α Antagonists in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: An Immunological Perspective. *BioDrugs.* 1 de Abril de 2014;28(S1):5–13.
 220. Smolen JS, Van Der Heijde DMFM, St.Clair EW, Emery P, Bathon JM, Keystone

- E, et al. Predictors of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with high-dose methotrexate with or without concomitant infliximab: Results from the ASPIRE trial. *Arthritis Rheum.* Março de 2006;54(3):702–10.
221. Quinn MA, Conaghan PG, O'Connor PJ, Karim Z, Greenstein A, Brown A, et al. Very early treatment with infliximab in addition to methotrexate in early, poor-prognosis rheumatoid arthritis reduces magnetic resonance imaging evidence of synovitis and damage, with sustained benefit after infliximab withdrawal: Results from a twelve-m. *Arthritis Rheum.* Janeiro de 2005;52(1):27–35.
222. St. Clair EW, van der Heijde DMFM, Smolen JS, Maini RN, Bathon JM, Emery P, et al. Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: A randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* Novembro de 2004;50(11):3432–43.
223. Haraoui B, Bykerk V. Etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ther Clin Risk Manag.* Fevereiro de 2007;3(1):99–105.
224. Keystone EC, Schiff MH, Kremer JM, Kafka S, Lovy M, DeVries T, et al. Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* Fevereiro de 2004;50(2):353–63.
225. Emery P, Breedveld FC, Hall S, Durez P, Chang DJ, Robertson D, et al. Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double-blind, parallel treatment trial. *Lancet.* Agosto de 2008;372(9636):375–82.
226. Emery P, Hammoudeh M, FitzGerald O, Combe B, Martin-Mola E, Buch MH, et al. Sustained Remission with Etanercept Tapering in Early Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 6 de Novembro de 2014;371(19):1781–92.
227. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, et al. A Trial of Etanercept, a Recombinant Tumor Necrosis Factor Receptor:Fc Fusion Protein, in Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Methotrexate. *N Engl J Med.* 28 de Janeiro de 1999;340(4):253–9.
228. Hyrich KL, Symmons DPM, Watson KD, Silman AJ. Comparison of the response

- to infliximab or etanercept monotherapy with the response to cotherapy with methotrexate or another disease-modifying antirheumatic drug in patients with rheumatoid arthritis: Results from the British Society for Rheumatology Bi. Arthritis Rheum. Junho de 2006;54(6):1786–94.
229. Efthimiou, Petryna, Kukar. Biological targets in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs. Biol Targets Ther. Setembro de 2009;3:443.
230. Chen D-Y, Chou S-J, Hsieh T-Y, Chen Y-H, Chen H-H, Hsieh C-W, et al. Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Comparative Study of Human Anti-TNF Antibody Adalimumab in Combination with Methotrexate and Methotrexate Alone in Taiwanese Patients with Active Rheumatoid Arthritis. J Formos Med Assoc. Abril de 2009;108(4):310–9.
231. Hoving JL, Bartelds GM, Sluiter JK, Sadiraj K, Groot I, Lems WF, et al. Perceived work ability, quality of life, and fatigue in patients with rheumatoid arthritis after a 6- month course of TNF inhibitors: prospective intervention study and partial economic evaluation. Scand J Rheumatol. 13 de Janeiro de 2009;38(4):246–50.
232. Hussain W, Janoudi N, Noorwali A, Omran N, Baamer M, Assiry EH, et al. Effect of Adalimumab on Work Ability Assessed in Rheumatoid Arthritis Disease Patients in Saudi Arabia (AWARDS). Open Rheumatol J. 10 de Julho de 2015;9(1):46–50.
233. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, Vollenhoven R van, et al. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previo. Arthritis Rheum. Janeiro de 2006;54(1):26–37.
234. Deeks ED. Certolizumab Pegol. Drugs. 22 de Janeiro de 2013;73(1):75–97.
235. Smolen J, Landewé RB, Mease P, Brzezicki J, Mason D, Luijtens K, et al. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. Ann Rheum Dis. Junho de 2009;68(6):797–804.

236. Raychaudhuri S, Mittal M. Golimumab and certolizumab: The two new anti-tumour necrosis factor kids on the block. *Indian J Dermatology, Venereol Leprol.* 2010;76(6):602.
237. Choy E, McKenna F, Vencovsky J, Valente R, Goel N, VanLunen B, et al. Certolizumab pegol plus MTX administered every 4 weeks is effective in patients with RA who are partial responders to MTX. *Rheumatology.* 1 de Julho de 2012;51(7):1226–34.
238. Keystone EC, Genovese MC, Klareskog L, Hsia EC, Hall ST, Miranda PC, et al. Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORWARD Study. *Ann Rheum Dis.* 1 de Junho de 2009;68(6):789–96.
239. Emery P, Fleischmann R, van der Heijde D, Keystone EC, Genovese MC, Conaghan PG, et al. The effects of golimumab on radiographic progression in rheumatoid arthritis: Results of randomized controlled studies of golimumab before methotrexate therapy and golimumab after methotrexate therapy. *Arthritis Rheum.* Maio de 2011;63(5):1200–10.
240. Xie X, Li F, Chen J-W, Wang J. Risk of tuberculosis infection in anti-TNF- α biological therapy: From bench to bedside. *J Microbiol Immunol Infect.* Agosto de 2014;47(4):268–74.
241. Bendtzen K. Immunogenicity of Anti-TNF- α Biotherapies: I. Individualized Medicine Based on Immunopharmacological Evidence. *Front Immunol.* 8 de Abril de 2015;6(April):152.
242. van der Laken CJ, Voskuyl AE, Roos JC, Stigter van Walsum M, de Groot ER, Wolbink G, et al. Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 11 de Agosto de 2006;66(2):253–6.
243. Finckh A. Evidence for differential acquired drug resistance to anti-tumour necrosis factor agents in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1 de Junho de 2006;65(6):746–52.

244. Thomas SS, Borazan N, Barroso N, Duan L, Taroumian S, Kretzmann B, et al. Comparative Immunogenicity of TNF Inhibitors: Impact on Clinical Efficacy and Tolerability in the Management of Autoimmune Diseases. A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioDrugs*. 18 de Agosto de 2015;29(4):241–58.
245. MERTENS M, SINGH JA. Anakinra for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *J Rheumatol*. 1 de Junho de 2009;36(6):1118–25.
246. Fleischmann RM, Schechtman J, Bennett R, Handel ML, Burmester G-R, Tesser J, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. Abril de 2003;48(4):927–34.
247. Hennigan S, Kavanaugh A. Interleukin-6 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ther Clin Risk Manag*. Agosto de 2008;4(4):767–75.
248. Choy EHS, Isenberg DA, Garrod T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, et al. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum*. Dezembro de 2002;46(12):3143–50.
249. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, et al. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition. *Mod Rheumatol*. 1 de Fevereiro de 2009;19(1):12–9.
250. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis*. 1 de Outubro de 2009;68(10):1580–4.
251. Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Bröll J, Balint G, et al. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete

- response to methotrexate. *Arthritis Rheum.* Setembro de 2006;54(9):2817–29.
252. Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: The tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug the. *Arthritis Rheum.* Outubro de 2008;58(10):2968–80.
253. Mok CC. Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update. *Drug Des Devel Ther.* Dezembro de 2013;8:87.
254. Edwards JCW, Szczepański L, Szechiński J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-Cell–Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 17 de Junho de 2004;350(25):2572–81.
255. Schiff M, Pritchard C, Huffstutter JE, Rodriguez-Valverde V, Durez P, Zhou X, et al. The 6-month safety and efficacy of abatacept in patients with rheumatoid arthritis who underwent a washout after anti-tumour necrosis factor therapy or were directly switched to abatacept: the ARRIVE trial. *Ann Rheum Dis.* 1 de Novembro de 2009;68(11):1708–14.
256. Burmester GR, Blanco R, Charles-Schoeman C, Wollenhaupt J, Zerbini C, Benda B, et al. Tofacitinib (CP-690,550) in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitors: a randomised phase 3 trial. *Lancet.* Fevereiro de 2013;381(9865):451–60.
257. Lee EB, Fleischmann R, Hall S, Wilkinson B, Bradley JD, Gruben D, et al. Tofacitinib versus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 19 de Junho de 2014;370(25):2377–86.
258. Gervasini G, Vagace JM. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Genet.* 2012;3(NOV):1–11.
259. Hattinger CM, Tavanti E, Fanelli M, Vella S, Picci P, Serra M. Pharmacogenomics of genes involved in antifolate drug response and toxicity in osteosarcoma. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4 de Março de 2017;13(3):245–57.

260. Zaruma-Torres F, Lares-Asseff I, Lima A, Reyes-Espinoza A, Loera-Castañeda V, Sosa-Macías M, et al. Genetic Polymorphisms Associated to Folate Transport as Predictors of Increased Risk for Acute Lymphoblastic Leukemia in Mexican Children. *Front Pharmacol.* 5 de Agosto de 2016;7(AUG):1–8.
261. XiaoBing L, Mingcai H, Wanping L, Li G, Chen M, Huihua D, et al. The association between reduced folate carrier-1 gene 80G/A polymorphism and methotrexate efficacy or methotrexate related-toxicity in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Int Immunopharmacol.* Setembro de 2016;38:8–15.
262. Hayashi H, Fujimaki C, Daimon T, Tsuboi S, Matsuyama T, Itoh K. Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes as a possible marker for predicting the outcome of methotrexate therapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharm Ther.* Junho de 2009;34(3):355–61.
263. Kung TN, Dennis J, Ma Y, Xie G, Bykerk V, Pope J, et al. RFC1 80G>A Is a Genetic Determinant of Methotrexate Efficacy in Rheumatoid Arthritis: A Human Genome Epidemiologic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Arthritis Rheumatol.* Maio de 2014;66(5):1111–20.
264. Drozdziak M, Rudas T, Pawlik A, Gornik W, Kurzawski M, Herczynska M. Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 27 de Dezembro de 2007;7(6):404–7.
265. Sen D, Paul JR, Ranganathan P. Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis. Em: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2014. p. 625–60. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0956-8_16
266. Gregers J, Christensen IJ, Dalhoff K, Lausen B, Schroeder H, Rosthøj S, et al. The association of reduced folate carrier 80G> A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood.* 2010;115(23):4671–7.
267. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Medeiros R, Seabra V. Pharmacogenomics of Methotrexate Membrane Transport Pathway: Can Clinical Response to Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Be Predicted? *Int J Mol Sci.* 16 de Junho de 2015;16(6):13760–80.

268. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* Julho de 2001;42(7):1007–17.
269. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, et al. Very important pharmacogene summary. *Pharmacogenet Genomics.* Março de 2011;21(3):152–61.
270. Qiu Q, Huang J, Lin Y, Shu X, Fan H, Tu Z, et al. Polymorphisms and pharmacogenomics for the toxicity of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 7 de Março de 2017;96(11).
271. Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, et al. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(5):546–54.
272. Kato T, Hamada A, Mori S, Saito H. Genetic Polymorphisms in Metabolic and Cellular Transport Pathway of Methotrexate Impact Clinical Outcome of Methotrexate Monotherapy in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27(2):192–9.
273. Ma CX, Sun YH, Wang HY. ABCB1 polymorphisms correlate with susceptibility to adult acute leukemia and response to high-dose methotrexate. *Tumor Biol.* 2015;36(10):7599–606.
274. van der Straaten R, Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Bogaartz J, et al. Exploratory analysis of four polymorphisms in human GGH and FPGS genes and their effect in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics.* Fevereiro de 2007;8(2):141–50.
275. Zhu H, Deng F-Y, Mo X-B, Qiu Y-H, Lei S-F. Pharmacogenetics and pharmacogenomics for rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate treatment: the 2013 update. *Pharmacogenomics.* Março de 2014;15(4):551–66.
276. Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milic V, Novakovic I, Damnjanovic T, et al. Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 5 de Março de 2013;69(3):377–83.

277. Chave KJ, Ryan TJ, Chmura SE, Galivan J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the human γ -glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene*. Novembro de 2003;319:167–75.
278. Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J*. 27 de Junho de 2013;13(3):227–34.
279. Wessels JAM, van der Kooij SM, le Cessie S, Kievit W, Barerra P, Allaart CF, et al. A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. Junho de 2007;56(6):1765–75.
280. Salazar J, Moya P, Albert A, César T, Casademont J, Gabaroi D, et al. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics*. 2014;15(8):1079–90.
281. Dulucq S, St-onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnett D, Labuda D, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood*. 2008;111(7):3692–700.
282. Dulucq S, St-Onge G, Gagne V, Ansari M, Sinnett D, Labuda D, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* [Internet]. 1 de Abril de 2008;111(7):3692–700. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-09-110593>
283. Lima A, Monteiro J, Bernardes M, Sousa H, Azevedo R, Seabra V, et al. Prediction of methotrexate clinical response in Portuguese rheumatoid arthritis patients: implication of MTHFR rs1801133 and ATIC rs4673993 polymorphisms. *Biomed Res Int*. 2014;2014:368681.
284. Wessels JAM, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YPM, Allaart CF, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum*. Abril de 2006;54(4):1087–

- 95.
285. Soukup T, Dosedel M, Pavek P, Nekvindova J, Barvik I, Bubancova I, et al. The impact of C677T and A1298C MTHFR polymorphisms on methotrexate therapeutic response in East Bohemian region rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 25 de Julho de 2015;35(7):1149–61.
286. Puranik Y, Puraniz A, Shintre P, Joshi K, Bhushan P, Lamba J, et al. Pharmacogenomics Folate metabolic pathway single nucleotide polymorphisms : a predictive. 2015;16(18):2019–34.
287. Kato T, Hamada A, Mori S, Saito H. Genetic Polymorphisms in Metabolic and Cellular Transport Pathway of Methotrexate Impact Clinical Outcome of Methotrexate Monotherapy in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27(2):192–9. D
288. D’Angelo V, Ramaglia M, Iannotta A, Crisci S, Indolfi P, Francese M, et al. Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(5):1339–46.
289. Ongaro A, De Mattei M, Della Porta MG, Rigolin G, Ambrosio C, Di Raimondo F, et al. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica.* 1 de Outubro de 2009;94(10):1391–8.
290. Braun J, Rau R. An update on methotrexate. *Curr Opin Rheumatol.* Maio de 2009;21(3):216–23.
291. DiPaolo A. The Role of Thymidylate Synthase as a Molecular Biomarker. *Clin Cancer Res.* 15 de Janeiro de 2004;10(2):411–2.
292. Lima A, Seabra V, Bernardes M, Azevedo R, Sousa H, Medeiros R. Role of Key TYMS Polymorphisms on Methotrexate Therapeutic Outcome in Portuguese Rheumatoid Arthritis Patients. Wang Y, editor. *PLoS One.* 3 de Outubro de 2014;9(10):e108165.
293. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and

- sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med*. 2003;11(5):593–600.
294. Mandola M V, Stoehlmacher J, Muller-weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz H, et al. A Novel Single Nucleotide Polymorphism within the 5' Tandem Repeat Polymorphism of the Thymidylate Synthase Gene Abolishes USF-1 Binding and Alters Transcriptional Activity A Novel Single Nucleotide Polymorphism within the 5' Tandem Repeat Polymorphism. *Cancer Res*. 2003;63:2898–904.
295. Krajcinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *Pharmacogenomics J*. 30 de Agosto de 2005;5(6):374–80.
296. Wessels JAM, Kooloos WM, Jonge R De, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Linssen A, et al. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. Setembro de 2006;54(9):2830–9.
297. Grabar PB, Rojko S, Logar D, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms in the adenosine pathway. *Ann Rheum Dis*. 1 de Maio de 2010;69(5):931–2. Disponível em: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2009.111567>
298. Lee YH, Bae S-C. Association of the ATIC 347 C/G polymorphism with responsiveness to and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 5 de Novembro de 2016;36(11):1591–9.
299. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics*. Outubro de 2009;19(10):823–8.
300. Lee YC, Cui J, Costenbader KH, Shadick NA, Weinblatt ME, Karlson EW. Investigation of candidate polymorphisms and disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Rheumatology*. 1 de Junho de 2009;48(6):613–7.
301. Iannaccone CK, Lee YC, Cui J, Frits ML, Glass RJ, Plenge RM, et al. Using genetic and clinical data to understand response to disease-modifying anti-

- rheumatic drug therapy: data from the Brigham and Women's Hospital Rheumatoid Arthritis Sequential Study. *Rheumatology*. 1 de Janeiro de 2011;50(1):40–6. D
302. Salazar J, Moya P, Altés A, Díaz-Torné C, Casademont J, Cerdà- Gabaroi, Dacia Corominas H, et al. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics*. 2014;15(8):1079–90.