

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

# **FITOQUÍMICA NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE**

Marta Sofia Barros Ponceano

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de: Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel

2020

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

# **FITOQUÍMICA NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE**

Marta Sofia Barros Ponceano

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de: Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel

2020



## FITOQUÍMICA NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

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.”

Marta Ponceano

.....

(assinatura)

Copyright: Marta Sofia Barros Ponceano

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

Só me foi possível a realização da presente dissertação de mestrado devido à colaboração e ao apoio de algumas pessoas, às quais a dedico e passo a agradecer.

Aos meus pais, pois foi graças eles que me foi possível a realização deste curso. Sempre me apoiaram e acreditaram nas minhas capacidades.

Às minhas irmãs, pela motivação que sempre me transmitiram e pelo apoio e paciência.

Ao meu namorado, que acreditou sempre em mim e nunca me deixou desistir. Tinha sempre as palavras certas para me incentivar.

Às minhas colegas de casa, por nos termos apoiado sempre umas às outras e por termos partilhado o mesmo espaço sempre de mãos dadas.

Às minhas colegas de curso, por terem partilhado comigo esta longa caminhada.

À professora Doutora Maria Graça da Costa Miguel, pela sua disponibilidade e orientação prestada.

Aos meus colegas de estágio, pela integração, ajuda e paciência, e por todo o conhecimento transmitido.

A todos vocês, dedico a presente dissertação e deixo o meu profundo agradecimento!

## **Resumo**

A artrite reumatoide é uma doença autoimune sistêmica crônica, caracterizada por inflamação sinovial, o que se traduz na destruição progressiva da cartilagem articular e dos ossos, e se não tratada, resulta em dor forte, edema, rigidez, perda de função articular, deformidade e incapacidade. Apresenta uma prevalência de 0,5 a 1% nos países Europeus e nos Estados Unidos da América, sendo mais prevalente no sexo feminino.

A etiologia e a fisiopatologia exatas desta doença ainda não são totalmente compreendidas, todavia acredita-se que interações complexas entre o sistema imunológico, fatores ambientais, genética e fatores epigenéticos estejam envolvidos na patogênese da mesma.

Segundo a Sociedade Portuguesa de Reumatologia, o diagnóstico deve ser realizado o mais precoce possível, o qual se baseia, principalmente, em manifestações clínicas, exames laboratoriais e radiográficos, por forma a iniciar rapidamente o tratamento, que tem como objetivo principal atingir a remissão da doença.

Atualmente existe uma ampla gama de medicamentos disponível para o tratamento da artrite reumatoide, porém estes estão associados a uma diversidade de efeitos colaterais indesejáveis, como distúrbios gastrointestinais, cardiovasculares e imunodeficiência, além de que alguns deles são bastante caros.

Assim sendo, os pesquisadores procuram terapias alternativas ou auxiliares, como os produtos obtidos a partir de plantas com atividade anti-inflamatória/antioxidante, porque estas contêm substâncias biologicamente ativas, que apresentam um grande potencial como agentes terapêuticos para a artrite reumatoide, quer sejam isolados, quer em combinação com certos fármacos antiartríticos convencionais.

Palavras-chave: artrite reumatoide, doença autoimune, etiologia, inflamação, plantas

## **Abstract**

Rheumatoid arthritis is a chronic systemic autoimmune disease, characterized by synovial inflammation, which translates into the progressive destruction of joint cartilage and bones, and if left untreated, results in severe pain, swelling, stiffness, loss of joint function, deformity and inability. It has a prevalence of 0.5 to 1% in European countries and the United States of America, being more prevalent in females.

The exact etiology and pathophysiology of this disease are not yet fully understood, however it is believed that complex interactions between the immune system, environmental factors, genetics, and epigenetic factors are involved in its pathogenesis.

According to Portuguese Society of Rheumatology, the diagnosis should be made as early as possible, which is based, mainly, on clinical manifestations, laboratory and radiographic exams, in order to quickly start the treatment, whose main objective is to achieve remission of the disease.

Actually, there is a wide range of drugs available for the treatment of rheumatoid arthritis, but these are associated with a variety of undesirable side effects, such as gastrointestinal disorders, cardiovascular and immunodeficiency, and some of them are quite expensive.

Therefore, researchers are looking for alternative or auxiliary therapies, such as products obtained from plants with anti-inflammatory/antioxidant activity, because they contain biologically active substances, which have great potential as therapeutic agents for rheumatoid arthritis, whether isolated, or in combination with certain conventional antiarthritic drugs.

Keywords: autoimmune disease, etiology, inflammation, plants, rheumatoid arthritis

## Índice

<b>Capítulo 1- Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2 – Doenças Autoimunes .....</b>	<b>2</b>
2.1- Artrite reumatoide.....	4
2.1.1- Epidemiologia.....	5
2.1.2- Classificação .....	7
2.1.2.1- Critérios de classificação .....	7
2.1.2.2- Classificação da artrite reumatoide nos diferentes estágios.....	10
2.1.2.2.1- Artrite reumatoide inicial.....	11
2.1.2.2.2- Autoimunidade sistémica associada à artrite reumatoide .....	11
2.1.2.2.3- Sintomas sem artrite clínica.....	13
2.1.3- Diagnóstico .....	17
2.1.3.1- Parâmetros laboratoriais.....	17
2.1.3.1.1-Autoanticorpos.....	17
2.1.3.1.1.1- ACPA-positivo <i>versus</i> ACPA-negativo.....	19
2.1.3.1.2- Reagentes de fase aguda .....	21
2.1.3.2 - Exames radiográficos.....	23
2.1.4- Sintomas/Queixas .....	25
2.1.5- Etiologia.....	29
2.1.5.1- Fatores genéticos.....	30
2.1.5.1.1- Fator de risco genético HLA.....	30
2.1.5.1.1.1- Organização génica do MHC.....	31
2.1.5.1.1.2- MHC e a artrite reumatoide .....	33
2.1.5.1.2- Fator de risco genético não-HLA.....	38
2.1.5.1.2.1- Proteína Tirosina Fosfatase Não recetora do tipo 22 .....	39
2.1.5.2- Fatores não genéticos .....	43
2.1.5.2.1- Tabagismo.....	43
2.1.5.2.2- Microbioma.....	47
2.1.5.2.3- Infecções.....	48
2.1.5.3- Epigenética.....	51
2.1.5.3.1- Metilação do DNA.....	53

2.1.5.3.2- MicroRNAs.....	56
2.1.5.3.3- Modificação de histonas .....	59
2.1.6- Terapêutica.....	62
2.1.6.1- Terapêutica farmacológica.....	62
2.1.6.1.1- Anti-inflamatórios não esteroides .....	64
2.1.6.1.2- Glucocorticoides .....	66
2.1.6.1.3- Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs .....	69
2.1.6.1.4- Analgésicos .....	72
2.1.6.2- Fitoterapia .....	73
2.1.6.2.1- Terpenóides e Terpenos .....	76
2.1.6.2.1.1- <i>Tripterygium wilfordii</i> Hook F.....	78
2.1.6.2.1.2- <i>Boswellia serrata</i> Roxb.ex Colebr. ....	82
2.1.6.2.1.3- <i>Harpagophytum procumbens</i> Burch.DC. ex Meisn. ....	85
2.1.6.2.2- Compostos fenólicos.....	88
2.1.6.2.2.1- <i>Curcuma longa</i> L. ....	90
2.1.6.2.2.2- <i>Zingiber officinale</i> Roscoe .....	95
2.1.6.2.2.3- <i>Urtica dioica</i> L.....	99
2.1.6.2.3- Outros.....	101
2.1.6.2.3.1- <i>Rosa canina</i> L. ....	102
<b>Capítulo 3- O papel do Farmacêutico na artrite reumatoide.....</b>	<b>103</b>
<b>Capítulo 4- Conclusão .....</b>	<b>108</b>
<b>Capítulo 5- Bibliografia .....</b>	<b>112</b>

## Índice de figuras

Figura 2.1- Cronologia da AR autoanticorpo positivo: diferentes estágios da doença.....	13
Figura 2.2- Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução do raio distal. Do lado esquerdo, de uma mulher com AR sem ACPA (ACPA <sup>-</sup> ); no meio, de uma paciente do sexo feminino ACPA <sup>+</sup> ; do lado direito de uma paciente da mesma idade, saudável.....	21
Figura 2.3- Imagem de um indivíduo com AR de início recente, que demonstra o edema nas articulações interfalângicas e metacarpofalângicas proximais, mais salientes na mão direita.....	26
Figura 2.4- Fotomicrografias e radiografias da mão do utente com AR.....	27
Figura 2.5- Alteração da seleção tímica, que permite a sobrevivência de mais células T autorreativas e o seu escape para a circulação, em resultado da variante LYP associada à doença.....	42
Figura 2.6- Demonstração das vias das cicloxigenases -1 e -2.....	65
Figura 2.7- Mecanismo de ação do glucocorticoide e do seu recetor.....	67

## Índice de tabelas

Tabela 2.1- Resumo das estimativas da frequência de AR em Portugal (2000 a 2009).....	6
Tabela 2.2- Prevalência das Doenças Reumáticas na população portuguesa.....	7
Tabela 2.3- Critérios de classificação para a AR por ACR/EULAR, 2010.....	9
Tabela 2.4- Características que definem artralgia segundo a EULAR.....	14
Tabela 2.5- Perceções da doença e as respostas obtidas dos pacientes.....	15
Tabela 2.6- Manifestações extra-articulares da AR.....	28
Tabela 2.7- Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença .....	70

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

aa- aminoácido

AA- Adjuvant-induced arthritis

Ac- Anticorpo

ACPA- Anti-Citrullinated Protein Antibody

ACPA<sup>+</sup>- ACPA-positivo

ACPA<sup>-</sup>- ACPA-negativo

ACR-American College of Rheumatology

ACTH- Adrenocorticotrophin-releasing hormone

Ag- Antígeno

AINEs- Anti-Inflamatórios Não Esteroides

AKBA- 3-O-Acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswellic Acid

anti-CCP- anti-Cyclic Citrullinated Peptide

AP1- Activator Protein 1

APCs- Antigen Presenting Cells

APS- artrite psoriática

AR- Artrite Reumatoide

ARA- American Rheumatism Association

Arg- arginina

AS- Arthritic Score

AVC- Acidente Vascular Cerebral

5'-azaC- 5'-azacitidina

$\alpha$ BA-  $\alpha$ -Boswellic Acid

BA- Boswellic Acid

BCR- B-Cell Receptor

bDMARDs- biologic DMARDs

BIS- bisdemethoxycurcumin

B19- parvovirus humano B19

β- beta

βBA- β-Boswellic Acid

C- citosina

cDAI- clinical Disease Activity Index

cDMARDs- conventional DMARDs

csDMARD- conventional synthetic DMARD

CGIs- ilhas CpG

CIA- Collagen Induced Arthritis

CM- curcumina

CMV- citomegalovirus

COX- cicloxygenase

CpG- cytosine-phosphate-guanine dinucleotid

cPLA<sub>2</sub>α- cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>α

CRF- Corticotrophin Releasing Factor

CSA- Clinically Suspect Arthralgia

CSK- C-terminal Src family Kinase

CV- cardiovascular

DA- Doença Autoimune

DAS- Disease Activity Score

DAS28- Disease Activity Score 28

DCs- Dendritic Cells

DEM- demethoxycurcumin

DMAPP- dimetilalil difosfato

DMARDs - Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs

DME- Durable Medical Equipment

DML- Differentially Methylated *Loci*

DMO- Densidade Mineral Óssea

DMT2- Diabetes Mellitus Tipo 2

DMT1- Diabetes Mellitus Tipo 1

DNA- Deoxyribonucleic acid

DNAm- DNA mensageiro

DNMTs- DNA-metiltransferases

DRM- Doença Reumática e Músculo-esquelética

DRPs- Drug-Related Problems

DRs- Doenças Reumatológicas

DTM- Disease Therapy Management

DT1- Diabetes Tipo 1

DT2- Diabetes Tipo 2

DZ- dizigóticos

D10G-1-Dehydro-[10]-Gingerdione

EA- Espondilite Anquilosante

EBV- Epstein-Barr vírus

EpiReumaPt- Estudo Epidemiológico das Doenças Reumáticas em Portugal

ERK1/2- Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2

ESR- Erythrocyte Sedimentation Rate

EUA- Estados Unidos da América

EULAR- European League Against Rheumatism

FDA- Food and Drug Administration

FLSs- Fibroblasts-Like Synoviocytes

Foxp3- Forkhead box P3

FR- Fator Reumatoide

FR<sup>+</sup>- FR-positivo

FR<sup>-</sup>- FR-negativo

GATA-3- GATA binding protein 3

GCs- glucocorticoides

GI- gastrointestinal

GLGPG-galactolipid (2S)-1,2-di-O-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoyl]-3-O-beta-d-galactopyranosyl glycerol

GR- Glucocorticoid Receptor

GWAS- Genome-Wide Association Study

HAQ- Health Assessment Questionnaire

HATs- Histone acetyltransferases

HDACi- HDAC inhibitor

HDACs- Histone deacetylases

HLA- Human Leukocyte Antigen

H2AK19Ub1- Histone H2A lys119 mono-ubiquitination

H3K4me3- Histone H3 lysine 4 trimethylation

H3K27me3- Histone H3 lysine 27 trimethylation

5-HETE- ácido 5-hidroxiieicosatetraenóico

IFN $\gamma$ - interferão gama

Igs- Imunoglobulinas

IgA- Imunoglobulina A

IgM- Imunoglobulina M

IgG- Imunoglobulina G

IL- interleucina

IL-1- interleucina-1

IL-1 $\beta$ - interleucina-1 $\beta$

IL-4- interleucina-4

IL-6- interleucina-6

IL-8- interleucina-8

IL-10- interleucina-10

IL-12- interleucina-12

IL-17- interleucina-17

IL-12p70- interleucina-12p70

IPP- isopentil pirofosfato

IV- intravenoso

iNOS- inducible Nitric Oxide Synthase

JAK- Janus kinase

JAK-1- Janus kinase-1

JAK-2- Janus kinase-2

JAK-3- Janus kinase-3

KBA- 11-Keto- $\beta$ -Boswellic Acid

kDA- kilodaltons

LDA- Low Disease Activity

LES- Lúpus Eritematoso Sistémico

LOX- lipoxigenase

LPSs- lipopolissacáridos

LYP- Lymphoid Tyrosine Phosphatase

5-LOX- 5-lipoxigenase

12- LOX- 12-lipoxigenase

MAPKs- Mitogen-Activated Protein Kinases

MCA-Medicina Complementar e Alternativa

MCP- metacarpophalangeal

MEC- Matriz extracelular

MEP- 2-C-Methyl-D-Erythriol 4-Phosphate

MHC- Major Histocompatibility Complex

miRNAs- microRNAs

MMPs- matrix metalloproteinases

MMP-1- matrix metalloproteinase-1

MMP-3- matrix metalloproteinase-3

MMP-9- matrix metalloproteinase-9

MMP-13- matrix metalloproteinase-13

mPGES-1- microsomal Prostaglandin E Synthase-1

MPO- mieloperoxidase

MTP- metatarsophalangeal

MTX- metotrexato

MVA- Mevalonate

MZ- monozigóticos

nb-DMARD- non biologic-DMARD

NFATc1- Nuclear Factor of Activated T cells, cytoplasmic 1

NF- $\kappa$ B- Nuclear Factor kappa B

NK- Natural Killer

NO- Nitric Oxide

NOSs- Nitric Oxide Synthases

OA- osteoartrite

OASFs- osteoarthritis synovial fibroblasts

OCs- osteoclasts

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPG- osteoprotogerina

ORs- Odds Ratio

PAD- Protein-Arginine Deiminase

PAD2- Protein-Arginine Deiminase 2

PBM- Pharmacy Benefits Management

PBMCs- Peripheral Blood Mononuclear Cells

pc- peso corporal

PCR- Proteína C Reativa

Pré-AR- Fase pré-clínica da AR

PGA- Patient Global Assessment

PG- prostaglandin

PGE2- prostaglandin E2

PGD2- prostaglandin D2

PIP- proximal interphalangeal

PKC- $\alpha$ - Protein Kinase C- $\alpha$

PLA2- phospholipase A<sub>2</sub>

PPAR- $\gamma$ - Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma

PTK- Protein Tyrosine Kinase

PTM- Post-Translational Mechanism

PTP- Protein Tyrosine Phosphatase

PTPN22- Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22

RANK- receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL- receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RASFs- Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts

RBCs- Red Blood Cells

RC- Radiografia Convencional

RM- Ressonância Magnética

RNA- ribonucleic acid

RNA<sub>m</sub>- RNA mensageiro

ROR $\gamma$ t- RAR-Related Orphan Receptor  $\gamma$ t

RR- Risco Relativo

RTX- Rituximab

SAM- S-Adenosil-L-Metionina

SDAI- Simplified Disease Activity Index

sDMARDs- synthetic DMARDs

SE- Shared Epitope

SE<sup>+</sup> - SE-positivo

SE<sup>-</sup> - SE-negativo

SFs- Synovial Fibroblasts

SJC- Swollen Joint Count

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Single Nucleotide Polymorphism

SPR- Sociedade Portuguesa de Reumatologia

STAT- Signal Transducer and Activator of Transcription

STAT3- Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T- timina

T-bet- T-box transcription factor TBX

TCR- T-Cell Receptor

TCZ- Tocilizumab

Th- T helper

Th1- T helper 1

Th2- T helper 2

Th3- T helper 3

Th17- T helper 17

TIMPs- tissue inhibitors of metalloproteinases

TJC- Tender Joint Count

TLR- Tool Like Receptor

TLR 2/6- Tool Like Receptor 2/6

TLR 4 - Tool Like Receptor 4

TLR 5- Tool Like Receptor 5

TNF- Tumor Necrosis Factor

TNF- $\alpha$ - Tumor Necrosis Factor-alpha

Treg- T regulatory cells

TRIF- TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

Trp- triptofano

tsDMARD- targeted synthetic DMARD

US- ultrassonografia

3'-UTR- 3'-untranslated regions

VAS- Visual Analogic Scale

VHS- velocidade de hemossedimentação

## Capítulo 1- Introdução

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença crônica, inflamatória, autoimune, de etiologia desconhecida, que se caracteriza por inflamação das articulações e que pode levar à destruição do tecido articular e periarticular o que, por sua vez, poderá conduzir a incapacidade grave e mortalidade prematura (1)(2).

Esta patologia afeta todas as idades e, apesar de apresentar como manifestação principal o envolvimento repetido e normalmente crônico das estruturas articulares e periarticulares, pode afetar o tecido conjuntivo em qualquer parte do organismo, o que se traduz nas mais variadas manifestações sistêmicas (3).

Tratando-se de uma doença autoimune (DA), significa que o sistema imunitário não está a funcionar de forma adequada (2). Existem autores que referem que a AR não é um distúrbio genético, mas há alguns pesquisadores que acreditam que alguns indivíduos têm genes que as tornam vulneráveis à patologia (4). No entanto, esses indivíduos nem sempre desenvolvem AR, exceto se os genes forem ativados, por exemplo, por infecções ou fatores ambientais (4). Por outro lado, há quem acredite que a AR é uma doença congênita, mas que ser portador de genes não torna as pessoas vulneráveis à patologia (5).

Doença relativamente comum, a AR apresenta uma prevalência de 0,5 a 1% em adultos que vivem em países industrializados, afetando com mais frequência as mulheres do que os homens (6)(7).

Os principais sintomas são dor, edema e rigidez das articulações e, possivelmente, degradação da cartilagem e ossos, o que pode culminar com a perda da função articular (8). Apesar das articulações serem o foco preponderante desta patologia, outros órgãos podem ser afetados, como o coração, os pulmões, os rins, entre outros (7)(8). Além disso, a AR pode causar fadiga, mal-estar e perda de peso (8).

Assim sendo, os objetivos finais da terapia da AR são a prevenção ou controlo dos danos nas articulações, evitar a perda de função e diminuir a dor (9). Assim, atualmente, as estratégias terapêuticas utilizadas conduzem a um alívio dos sintomas ou modificam o processo da doença (10). Para tal pode recorrer-se aos fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs, do inglês "Disease-Modifying

Antirheumatic Drugs"), que se dividem em dois grupos, DMARDs sintéticos (sDMARDs, do inglês synthetic DMARDs) e DMARDs biológicos (bDMARDs, do inglês biologic DMARDs); os glucocorticoides (GCs); os Anti-Inflamatórios Não Esteroides (AINEs) e analgésicos (11)(12).

Ao longo dos últimos anos, o tratamento desta patologia sofreu profundas modificações devido ao conhecimento dos fatores de pior prognóstico, da avaliação da atividade inflamatória, do uso precoce de antirreumáticos de ação lenta, do aparecimento da terapêutica combinada e, nos últimos anos, da introdução da terapêutica biológica (3).

Apesar das estratégias terapêuticas utilizadas serem eficazes, o seu uso é limitado devido aos seus efeitos colaterais, de entre os quais fazem parte úlceras e perfurações gastrointestinais (GIs), complicações cardiovasculares (CVs) e o surgimento de infecções oportunistas devido aos imunossupressores (10). Além desses efeitos, surge também a dor musculoesquelética associada ao uso prolongado de analgésicos opioides, uma vez que a sua prescrição é comum em doentes com dor associada à AR (13)(14). Por outro lado, os GCs, amplamente utilizados no tratamento desta patologia desde a década de 1950, continuam a ser usados em cerca de metade dos doentes com AR (15). Estes últimos, apesar de terem muitos benefícios também apresentam riscos associados, incluindo um possível aumento do risco de eventos CVs e mortalidade (15).

## **Capítulo 2 – Doenças Autoimunes**

As DAs são de uma grande complexidade e multifatoriais, e caracterizam-se pela perda de tolerância imunológica a autoantígenos, o que faz com que o sistema imunológico ataque os próprios tecidos, podendo causar danos sistêmicos (como o lúpus) ou específicos de órgãos [como a Diabetes Tipo 1 (DT1)] (16)(17)(18)(19). Em condições normais, os processos de tolerância imunológica, central e periférica, fazem com que o sistema imunológico não reaja contra os próprios antígenos (Ags) (20).

O termo de tolerância imunológica foi apresentado pela primeira vez por Sir Macfarlane Burnett e Sir Peter Medawar após a realização de estudos sobre a resposta a

transplantes (21). Porém, transformou-se num conceito que hoje é crucial para entender o funcionamento do sistema imunológico (21). A tolerância tem como objetivo final a eliminação física (deleção) e/ou funcional (anergia/supressão) de linfócitos potencialmente autorreativos (21).

Originalmente, Ag foi definido como uma molécula ou substância capaz de ser reconhecida por um anticorpo (Ac) (22). Atualmente, esse termo emprega-se a qualquer molécula ou substância capaz de ativar linfócitos T, induzindo uma resposta imunológica celular, bem como linfócitos B e, deste modo, induzindo uma resposta imunológica humoral (22).

Por sua vez, Acs ou Imunoglobulinas (Igs) solúveis são proteínas segregadas pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados), que percorrem o sangue e fluidos tecidulares com o objetivo de encontrarem moléculas antigénicas específicas (responsáveis pela síntese desses Acs) às quais se ligam, por forma a desencadarem uma série de respostas imunológicas para provocarem a eliminação do agente que transporta o Ag (22). Assim sendo, a resposta autoimune é levada a cabo pelos linfócitos T e B, cujo papel é produzir mediadores solúveis [por exemplo, citocinas, monóxido de azoto (NO, do inglês Nitric Oxide), entre outros] e autoanticorpos, o que pode ter repercussões a nível sistémico ou apenas em um órgão (17).

Foi durante o século XX que se identificaram as DAs, ao se detetar que autoanticorpos reagem com diferentes componentes dos órgãos envolvidos em patologias humanas, o que deu a entender que o sistema imunológico pode ser autoagressivo (23).

As DAs definem uma família heteróloga de doenças crónicas debilitantes, dotada de uma vasta gama de sintomas clínicos (24). Em função do tipo, estas doenças interferem com diferentes tipos de tecido, como, no caso da DT1, em que afeta as células pancreáticas (24).

As DAs são patologias crónicas comuns, cuja prevalência estima-se ser de 3.225/100.000 e são uma causa frequente de morbi-mortalidade (17). A sua prevalência atinge pelo menos 5% dos Europeus, dos quais 2/3 são mulheres, estando inseridas nas 10 principais causas de morte no sexo feminino (23).

No estudo “The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing”, agruparam as várias DAs por categorias e verificaram que o maior aumento percentual, por ano, foi nas Doenças Reumatológicas (DRs) (7,1), seguido pelas doenças endócrinas (6,3), GIs (6,2) e neurológicas (3,7) (25). Acredita-se que vários fatores estão a impulsionar esses processos evolutivos recentes, como é o caso do *status* socioeconómico, o rápido aumento destas doenças nos países desenvolvidos, bem como observações em populações migrantes selecionadas, que apontam para alguma forma de impacto ambiental, ao invés de influências genéticas de longo prazo (25). A frequência de DAs aumentou significativamente nos últimos 30 anos, o que levou a questionar os fatores que contribuem para esse aumento (25). Dada a constância da genética, o foco vira-se para os fatores ambientais, particularmente, o estilo de vida ocidental (25). Nas últimas décadas, de facto, têm-se verificado alterações significativas nos hábitos alimentares ocidentais, meio ambiente e exposição à poluição, habitat infeccioso e stress, o que levou a um aumento paralelo das DAs (25).

Cerca de 5 a 10% da população em todo o mundo é afetada por este tipo de patologias, sendo consideradas como uma das principais causas de morbi-mortalidade (19). As DAs são marcadas por elevadas taxas de incapacidade e comorbidade, assim como pelo aumento das despesas de tratamento, o que lhes atribui um encargo económico (19).

Na artrite inflamatória autoimune existe comprometimento do tecido sinovial nas articulações e culmina na destruição da cartilagem articular (24). Esta abarca um grupo heterogéneo de distintos tipos de artrite, inclusive AR, artrite associada a doenças do tecido conjuntivo ou vasculite e a família de espondiloartrite, da qual fazem parte, Espondilite Anquilosante (EA), artrite psoriática (APS), artrite reativa ou artrite enteropática associada com doença inflamatória intestinal (24).

## 2.1- Artrite reumatoide

A AR é uma DA crónica, caracterizada pela inflamação e hiperplasia das membranas sinoviais, nas articulações diartrodiais, assim como pela produção de autoanticorpos (26). Esta patologia pode causar destruição articular e óssea, caso não

seja controlada, o que pode resultar em incapacidade funcional, bem como redução da qualidade e expectativa de vida, sobretudo pelo aumento do risco de eventos CVs (26).

Como DA, a AR é uma patologia que se caracteriza pela presença de disfunção do sistema imunológico (27). Todavia, para além disso, os indivíduos apresentam ainda, frequentemente, inatividade severa, como resultado de problemas de dor e fadiga (27). Por sua vez, a inatividade conduz a uma má função muscular, baixa aptidão cardiorrespiratória e agravamento da incapacidade (27).

Até então não se conhece o mecanismo exato pelo qual se inicia e progride a patologia (28). Deste modo, considerada uma doença multifatorial, é provável que a mesma seja causada por uma combinação de cofatores genéticos, ambientais, hormonais e infecciosos, que interagem de forma complexa (28).

No caso da patogénese da AR, estudos genéticos abordaram a importância do antígeno leucocitário humano (*HLA*, do inglês "Human Leukocyte Antigen")-DRB1, assim como de outros genes [proteína tirosina fosfatase não recetora tipo 22 (*PTPN22*, do inglês Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22) *TRAF1-C5* e *Ccr6*] (24). Deste modo, essas associações genéticas encaixam-se na noção global de que a artrite inflamatória autoimune é uma patologia orientada por Acs e células T, além de estarem também envolvidas citocinas inflamatórias [como o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês Tumor Necrosis Factor), o interferão-gama ( $IFN\gamma$ ), interleucina (IL)-17 (IL-17) e IL-1 $\beta$ ] (24).

Uma vez que o sistema imunológico se encontra comprometido, recorre-se a medicamentos imunossuppressores, o que se traduz num aumento do risco de infeções oportunistas, quer sejam bacterianas ou virais (27). Assim sendo, com vista a uma melhoria do estado de saúde e da qualidade de vida destes doentes, torna-se necessário reconhecer métodos para reduzir esses riscos e melhorar a imunidade antibacteriana (27).

### 2.1.1- Epidemiologia

A AR é uma patologia de distribuição universal, para a qual não existem relatos de áreas ou grupos étnicos onde a mesma não seja encontrada (29). A prevalência global

estimada para esta patologia varia entre 0,5 e 1,0% e, em alguns estudos, verifica-se que a incidência da mesma é maior nos países industrializados e em áreas urbanas (30). A prevalência da AR é de 0,5 a 1% nos países Europeus e Estados Unidos da América (EUA) (31). Em Portugal estima-se que afete 0,8 a 1,5% da população (2).

A nível geral, o sexo feminino apresenta o dobro ou mais, da probabilidade de vir a desenvolver a doença, do que o sexo masculino, sendo o seu pico de incidência após a menopausa (2)(29)(32). Em adultos, o risco ao longo da vida, de vir a desenvolver a patologia é de 3,6% (1 em 28) para as mulheres e 1,7% (1 em 59) para os homens (29). Pessoas de todas as idades podem desenvolver esta patologia, incluindo adolescentes, embora seja mais frequente entre os 30 e os 50 anos de idade (31)(33)(34).

No documento referido pela Rede de Referenciação Hospitalar de Reumatologia, a prevalência de AR foi 0,3% (34). Em 2001, a prevalência de AR em Portugal foi estimada em cerca de 0,8%, 2 a 4 casos por 10.000 pessoas, anualmente (34). Na Tabela 2.1 está apresentado um resumo dos resultados de estudos, que estimaram a frequência de AR em Portugal, cuja data de publicação é referente de 2000 a 2009 (34).

Tabela 2.1- Resumo das estimativas da frequência de AR em Portugal (2000 a 2009). Adaptado de (34).

Primeiro autor, ano de publicação	Método de recolha de informação	Definição do caso	População em estudo	Tamanho amostral	Estimativa
Costa, 2004	Entrevista presencial	História de diagnóstico médico de AR (autodeclarada)	População adulta residente na cidade do Porto	1238	Prevalência de AR: Ambos os sexos: 1,6% (IC95%: 1,0-2,5) H:0,0% (IC95%: 0,0-1,1) M:2,5% (IC95%: 1,5-3,9)
ONDOR, 2007	Entrevista telefónica	História de diagnóstico médico de AR (autodeclarada)	População adulta residente em Portugal Continental, com telefone fixo da Portugal Telecom	980	Prevalência de AR: Ambos os sexos: 6,1% (IC95%: 4,7-7,8)
ONDOR, 2009	Entrevista presencial e exame clínico	Exames clínico e radiográfico sugestivos de AR	População adulta residente na cidade do Porto	1682	Prevalência de AR: H:0,0% (IC95%: 0,0-0,6) M:0,4% (IC95%: 0,1-1,0)

Legenda: H- Homens; M- Mulheres; IC95%- Intervalos de confiança a 95%.

Segundo o estudo EpiReumaPt (Estudo Epidemiológico das Doenças Reumáticas em Portugal), realizado entre setembro de 2011 e dezembro de 2013, no Continente e nas Regiões Autónomas da Madeira e dos Açores, a prevalência geral de AR é de 0,7%, com maior prevalência no sexo feminino do que no sexo masculino (1,1% vs 0,3%), como se pode ver na Tabela 2.2 (35).

Tabela 2.2- Prevalência das Doenças Reumáticas na população portuguesa. Adaptado de (35).

	Prevalência no geral	Prevalência nas mulheres	Prevalência nos homens
Lombalgia	26.4	29.6	22.8
Fibromialgia	1.7	3.1	0.1
Osteoartrose do Joelho	12.4	15.8	8.6
Osteoartrose da Mão	8.7	13.8	3.2
Osteoartrose da Anca	2.9	3.0	2.9
Osteoporose	10.2	17.0	2.6
Patologia Periarticular	15.8	19.1	12.0
<b><u>Artrite Reumatoide</u></b>	<b><u>0.7</u></b>	<b><u>1.1</u></b>	<b><u>0.3</u></b>
Espondilartrites	1.6	2.0	1.2
Lúpus Eritematoso Sistémico	0.1	0.2	0.04
Polimialgia Reumática	0.1	0.1	0.06
Gota	1.3	0.08	2.6

Tendo em conta as projeções da população para 2017, estimou-se que havia próximo de 62 mil casos prevalentes (30). Do ponto de vista regional, a prevalência é mais marcante no Alentejo (1,8%), Algarve (1,2%) e Açores (1,1%) (30).

## 2.1.2- Classificação

### 2.1.2.1- Critérios de classificação

Ao longo dos tempos, são vários os critérios de classificação que têm sido propostos e utilizados para a AR, em todo o mundo (36). No ano de 1956, um conjunto de critérios foi desenvolvido pelo subcomité da associação americana de reumatismo

(ARA, do inglês American Rheumatism Association) que, anos mais tarde, em 1958, foi revisto (36). O conjunto de critérios adotado em 1958 foi utilizado durante quase 30 anos (36). Este tinha em conta as características da doença (que incluía a duração dos sintomas, envolvimento articular e autoimunidade) que mostravam alta especificidade (para a AR definida/provável) ou alta sensibilidade (para possível AR) (36).

Porém, em 1987 surgiu uma proposta, por parte do colégio americano de reumatologia (ACR, do inglês American College of Rheumatology), para o desenvolvimento de novos critérios, como resultado do crescente conhecimento sobre a patogénese da AR e da necessidade de distinguir outras formas de artrites soronegativas, como espondiloartrite, doença de deposição de pirofosfato de cálcio, artrite de Lyme e polimialgia reumática da AR soronegativa (36)(29). Estes critérios permitem fazer a distinção entre a AR estabelecida e outras DRs (1). Todavia, embora estes critérios fossem mais específicos, eram menos sensíveis que os de 1958 e, ainda, apresentavam baixo desempenho, especialmente no que respeita à baixa sensibilidade em pacientes com artrite inflamatória precoce (36). Portanto, embora fossem aceites para a definição da doença, falhavam por não serem úteis na identificação de pacientes que beneficiariam de uma intervenção eficaz precoce, uma vez que foram obtidos pela tentativa de distinguir pacientes com AR estabelecida daqueles com uma combinação de outros diagnósticos reumatológicos definidos (1).

Assim sendo e, particularmente, por se reconhecer que uma intervenção terapêutica precoce melhora significativamente os resultados clínicos e reduz o dano articular e a incapacidade em pacientes com AR, a ACR em colaboração com a liga europeia contra o reumatismo (EULAR, do inglês European League Against Rheumatism), criaram um novo conjunto de critérios para a classificação da AR, em 2010 (1)(36). Estes novos critérios surgem como um esforço para diagnosticar a AR mais cedo, em pacientes que não respondem aos critérios de 1987 (33). Por outras palavras, servem para facilitar o estudo de pessoas que se encontram em estágios iniciais da doença, o que possibilita o impedimento da destruição óssea e a progressão radiológica, devido ao uso dos DMARDs (36)(29).

Os critérios publicados em 2010 baseiam-se numa pontuação ponderada em torno de 4 categorias, que incluem: a distribuição e o tipo de articulação envolvida (com pontuação de 0 a 5), a sorologia [da qual faz parte o Fator Reumatoide (FR) ou o anticorpo anti-proteína citrulinada (ACPA, do inglês Anti-Citrullinated Protein

Antibody), sendo ponderada de acordo com os níveis de Acs ,com pontuação de 0 a 3], a duração dos sinais ou sintomas de sinovite (por exemplo, dor, edema, sensibilidade, com pontuação de 0 a 1) e reagentes de fase aguda [taxa de sedimentação de eritrócitos (ESR, do inglês Erythrocyte Sedimentation Rate) ou Proteína C Reativa (PCR), com pontuação de 0 a 1] (1)(37)(29). Esta informação encontra-se compilada na Tabela 2.3 (1).

*Tabela 2.3- Critérios de classificação para a AR por ACR/EULAR, 2010. Adaptado de (1).*

<b>Critérios</b>	<b>Pontuação</b>
<b>1. Articulação envolvida</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 articulação grande</li> <li>• 2-10 articulações grandes</li> <li>• 1-3 articulações pequenas (as articulações grandes não se contam)</li> <li>• 4-10 articulações pequenas (as articulações grandes não se contam)</li> <li>• &gt;10 articulações (com pelo menos 1 articulação pequena)</li> </ul>	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b> <b>3</b> <b>5</b>
<b>2. Sorologia</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ACPA e FR negativos</li> <li>• ACPA ou FR baixo-positivo</li> <li>• ACPA ou FR alto-positivo</li> </ul>	<b>0</b> <b>2</b> <b>3</b>
<b>3. Reagentes de fase aguda</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR e ESR normais</li> <li>• PCR e ESR anormais</li> </ul>	<b>0</b> <b>1</b>
<b>4. Duração dos sintomas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;6 semanas</li> <li>• ≥6 semanas</li> </ul>	<b>0</b> <b>1</b>

Assim sendo, segundo estes critérios, para se considerar que um indivíduo está num estado inicial da doença, e que por isso requer o uso de DMARDs (como por exemplo, o metotrexato [MTX]), tem de ter uma pontuação igual ou superior a 6 (1)(37)(29).

Para que estes critérios possam ser utilizados é necessário que os doentes apresentem sinovite clínica em pelo menos uma articulação, que não seja melhor esclarecida por um diagnóstico alternativo (1)(37)(29). Por outro lado, os mesmos não têm em conta a presença de nódulos reumatóides ou alterações erosivas radiográficas, menos comuns no início da doença (33). Além disso também não consideram necessária

a presença de artrite simétrica, possibilitando uma apresentação assimétrica precoce (33).

#### 2.1.2.2- Classificação da artrite reumatoide nos diferentes estágios

O Comitê Permanente de Reumatologia Investigativa da EULAR criou um grupo, o grupo de estudo para fatores de risco para a AR, por forma a facilitar a pesquisa nesta área (38). Os principais objetivos eram o desenvolvimento de um parecer mais preciso dos mecanismos responsáveis por estimular as anormalidades imunológicas durante a fase pré-clínica da AR (pré-AR), bem como dos estímulos que a transformam numa doença centrada nas articulações, de forma a fornecer informação acerca dos desenvolvimentos clinicamente relevantes nos resultados da previsão e terapia (38). Ou seja, facilitar a pesquisa das fases pré-clínica e clinicamente aparente da AR (38).

A AR apresenta um período denominado de doença pré-clínica, que pode ser dividido em várias fases (39). Uma vez que existem vários termos para descrever indivíduos que ainda não preenchem os critérios de classificação da AR, incluindo “AR inicial”, “AR muito precoce” e “pré-AR”, foram propostas orientações acerca de abordagens para descrever fases específicas, antes do desenvolvimento da AR (38). Assim sendo, o grupo de estudo da EULAR recomendou que, em estudos prospetivos, indivíduos que ainda não apresentassem AR fossem descritos como tendo: (A) fatores de risco genéticos para AR; (B) fatores de risco ambientais para AR; (C) autoimunidade sistémica associada à AR; (D) sintomas sem artrite clínica; (E) artrite não classificada (38).

O campo da reumatologia cada vez mais se direciona no sentido de identificar indivíduos que apresentam maior risco de desenvolver AR, num estágio em que a artrite ainda não está presente, mas em que há artralgia clinicamente suspeita (CSA, do inglês Clinically Suspect Arthralgia), isto é, pacientes com sintomas articulares sem sinais de artrite (40)(41).

#### 2.1.2.2.1- Artrite reumatoide inicial

A AR caracteriza-se por inflamação do tecido sinovial e, como tal, a sinóvia é o seu alvo principal (42)(43). Aquando da avaliação das características da inflamação da sinóvia de pacientes com AR inicial (sinais e sintomas <1 ano) foi demonstrado que, a infiltração celular, assim como a expressão de citocinas, quimiocinas, granzimas, moléculas de adesão e metaloproteínases da matriz (MMPs, do inglês matrix metalloproteinases) são, em média, idênticas às observadas na doença de longa data, cuja duração é superior a 5 anos (43). Assim sendo, a AR inicial já apresenta inflamação crónica do tecido sinovial, o que é apoiado pela análise, nos estágios muito precoces da doença, de danos radiológicos (43). Isso permitiu a sugestão da existência de uma fase definida por alterações inflamatórias na sinóvia, precedente ao início dos sinais e sintomas clínicos, denominada pré-AR (43).

A identificação de fases pré-clínicas é de grande importância pois permite intervir, visando os processos relacionados, com a finalidade de precaver ou atrasar o desenvolvimento da artrite clinicamente evidente (44)(45).

#### 2.1.2.2.2- Autoimunidade sistémica associada à artrite reumatoide

O termo “autoimunidade sistémica associada à AR” refere-se à fase durante a qual diversos compartimentos do corpo podem apresentar irregularidades antes da expressão clínica da doença (38). Sabe-se que, na fase estabelecida da doença, a sinóvia é o local principal da mesma, no entanto, pode não corresponder ao local onde a patologia se iniciou (38).

Nos últimos tempos as investigações têm-se centrado nas fases iniciais da doença, divulgando que pode ocorrer uma fase de autoimunidade sistémica muitos anos antes do desenvolvimento da artrite clinicamente evidente, para aqueles que são soropositivos (46)(47)(43). Autoanticorpos relacionados com a doença, um aumento de reagentes de fase aguda, bem como de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias podem ser vistos no sangue periférico de indivíduos em risco de desenvolver a doença, cerca de 5 anos antes que a artrite se torne clara (46)(48)(49).

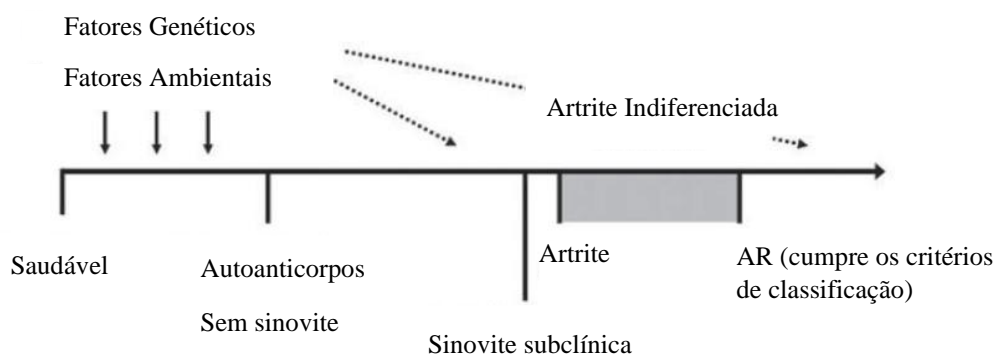
Em indivíduos que apresentam susceptibilidade genética, a presença de fatores ambientais (como o tabagismo e, possivelmente, a periodontite) pode culminar na formação de autoanticorpos, como o FR e o ACPA, que caracterizam os indivíduos com autoimunidade sistêmica associada à AR (42). Os mesmos podem ser formados vários anos antes do aparecimento de sinais e sintomas clínicos da AR (Figura 2.1) (43). Em indivíduos com artralgia, na presença desses Acs, têm uma probabilidade de cerca de 30% de vir a desenvolver a doença dentro de 1 ano (38).

Num estudo prospetivo duma coorte de indivíduos positivos para autoanticorpos, com possibilidade de desenvolverem a doença, verificaram que não existia inflamação sinovial clara antes da evolução para AR clinicamente evidente (42). O mesmo foi demonstrado por van de Sande et al., através de Ressonância Magnética (RM), em indivíduos soropositivos sem histórico de artrite (43).

Todavia, ainda no primeiro, verificaram que houve uma propensão para um aumento do número de células T sinoviais em indivíduos que, mais tarde, desenvolveram artrite, comparativamente com os que ainda não tinham desenvolvido (42). Isto sugere que o início da artrite pode ser precedido por infiltração da sinóvia pelas células T, porém são necessários mais estudos (42). E, além disso, esse efeito é mais forte, aquando da presença de ACPA (42).

Assim sendo, sugere-se que o processo de infiltração pelas células inflamatórias seja algo que ocorra mais perto do início da AR clinicamente evidente e, assim sendo, de um modo geral, em indivíduos que apresentam risco de desenvolver a doença, não existe sinovite subclínica “aberta” mais de um mês antes do início da artrite (42). O mesmo foi demonstrado por van de Sande et al. ao descobrirem, em indivíduos que desenvolveram artrite, após um acompanhamento de cerca de 3 meses, que a sinóvia era normal, o que os levou a postular que a fase de sinovite (subclínica) está na faixa de semanas, e não de meses (Figura 2.1) (43).

Figura 2.1- Cronologia da AR autoanticorpo-positivo: diferentes estágios da doença. Adaptado de (43).



Portanto, como referido anteriormente, foi sugerido que em pacientes com artralgia ACPA-positivo (ACPA<sup>+</sup>), a autoimunidade sistêmica antecede o desenvolvimento de inflamação sinovial (43). Por outro lado, uma vez que a formação destes autoanticorpos antecede o início da doença, foi sugerido que o seu desenvolvimento se deve a um processo que tem início com a inflamação em outros locais, como por exemplo, nos pulmões (50).

Além disso, verifica-se uma relação entre os agentes que causam inflamação nos pulmões (como o fumo do tabaco e o pó de sílica) e a ocorrência de AR ACPA<sup>+</sup> (50). No estudo realizado por Demoruelle et al., verificaram que as anomalias das vias aéreas estavam presentes numa grande proporção de indivíduos positivos para autoanticorpos, mas que não apresentavam artrite inflamatória e que essas eram semelhantes às observadas em indivíduos com AR inicial (51). Tal sugere o pulmão como local inicial da lesão autoimune e com grande capacidade de criar a autoimunidade relacionada com a AR (51).

#### 2.1.2.2.3- Sintomas sem artrite clínica

Como já referido, a artrite clínica pode ser precedida por uma fase sintomática (52). Esta fase é a primeira oportunidade de reconhecer, de um ponto de vista clínico, pacientes que estão em risco de progredirem para AR (41). Enquanto que fatores de risco genéticos e sorológicos foram amplamente estudados, o mesmo não se pode

afirmar em relação à fase dos sintomas sem artrite clínica (39)(41). Mais precisamente, na pré-AR, ainda não foram estudados o tipo de artralgia, bem como os sintomas concomitantes característicos desta fase (39).

Ainda que alguns estudos relatem sintomas que pacientes sofrem nesta fase, bem como o impacto na sua vida quotidiana, características clínicas específicas até então não tinham sido reconhecidas por uma abordagem baseada num consenso, o que dificulta a execução de estudos e ensaios clínicos nesta fase (53)(40)(41).

Assim sendo, foi aceite que a artralgia com suspeita de progressão para AR fosse definida por 7 parâmetros, os quais estão apresentados na Tabela 2.4 (41). Assim como também foi aceite que os mesmos não podem ser utilizados em indivíduos que não aqueles que apresentem artralgia, para os quais não há uma melhor explicação para a artralgia (41).

*Tabela 2.4- Características que definem artralgia segundo a EULAR. Adaptado de (41).*

<b>Parâmetros</b>
<b>História:</b>
✓ Início recente de sintomas articulares (duração <1 ano)
✓ Sintomas localizados nas articulações metacarpofalângicas (MCP, do inglês metacarpophalangeal)
✓ Rigidez matinal de duração ≥ 60 minutos
✓ Sintomas mais graves no início da manhã
✓ Presença de um parente de 1º grau com AR
<b>Exame físico:</b>
✓ Dificuldade em fazer punho cerrado
✓ Teste de compressão positivo das articulações MCP

O estudo realizado por Newsum et al. faz referência a uma vasta variedade de sinais e sintomas presentes nesta fase (40). As opiniões de indivíduos com CSA acerca da sua condição são uma incógnita e a inclusão das mesmas nos cuidados reumatológicos é essencial (40). Assim sendo, o objetivo deste estudo foi colmatar essa

situação, procurando saber as percepções da doença e os pontos de vista de supostos prognósticos para o desenvolvimento de AR (40). Relativamente às percepções da doença, observaram-se 4 com frequência (identidade, consequências, controle pessoal e preocupação), que se encontram apresentadas na Tabela 2.5, acompanhadas dos resultados (40). No que respeita às opiniões sobre os prognósticos para desenvolver a doença, os indivíduos preferiam ter informações sobre a origem dos seus sintomas (40).

*Tabela 2.5- Percepções da doença e as respostas obtidas dos pacientes. Adaptado de (40).*

<b>PERCEÇÕES DA DOENÇA</b>	<b>RESPOSTA</b>
<b>IDENTIDADE</b> “VOCÊ SENTE QUE ESTÁ DOENTE?” “VOCÊ É PACIENTE?”	Todos os pacientes responderam por unanimidade “não”.
<b>CONSEQUÊNCIAS</b>	Dificuldades para calçar os sapatos; Diminuição da capacidade na realização de "hobbies"; Evitar aperto de mão devido à dor; Dificuldades em manter a rede social e vida de estudante devido à dor e falta de conhecimento sobre os seus sintomas.
<b>CONTROLE PESSOAL</b>	Adoção de comportamentos promotores de saúde (ex: ioga).
<b>PREOCUPAÇÃO</b>	Foi mencionado preocupações sobre dor, dúvidas do progresso da dor, desenvolvimento de limitações funcionais e prognóstico.

Até agora não se sabe se pacientes com artralgia em risco de desenvolverem a doença já apresentam incapacidade funcional, assim como também não é conhecido se a mesma está associada à inflamação subclínica e se aumenta durante a progressão para artrite clínica (52).

Deste modo, com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre as experiências de pacientes a respeito da função física numa fase pré-artrite sintomática, realizou-se um estudo que avaliou pacientes com CSA, em risco de progredirem para AR (52). Do estudo concluíram que na fase pré-artrite sintomática já existe incapacidade funcional e que a sua gravidade é semelhante à da artrite clínica (52). Além disso, verificaram também, por RM, que a gravidade da inflamação subclínica está relacionada com a gravidade da incapacidade funcional, o que significa que esta,

em certa medida, está relacionada à inflamação (52). Um estudo anterior de Burgers et al. demonstrou a importância funcional da inflamação na artrite precoce, detetada por RM (54). Tal se deve ao facto da inflamação, detetada por RM, particularmente a tenossinovite, estar associada à incapacidade funcional (54).

Um outro estudo realizado anteriormente demonstrou que a carga da doença (avaliada pela dor, fadiga, incapacidade e qualidade de vida), bem como os níveis de consumo em saúde, no geral, foram idênticos em pacientes com artralgia sem sinovite e pacientes com AR inicial, apesar da ausência de um processo inflamatório subjacente (55).

Esta conjectura é ainda mais sustentada pelos resultados obtidos de que não houve um aumento na incapacidade funcional nos pacientes com CSA que evoluíram para AR clínica, portanto a incapacidade máxima foi atingida ainda na fase de CSA (52). Assim sendo, embora a fase de artrite clinicamente evidente seja importante para o reumatologista, pois pode ser necessário iniciar terapia com um DMARD, do ponto de vista funcional, para os pacientes, é menos importante (52). Do ponto de vista do doente, na pré-AR, o ónus da doença já é grave, porém dos estudos que estão a ser realizados ainda não houve transmissão de resultados positivos e, deste modo, não existem evidências científicas que afirmem o início da terapêutica com DMARD sem artrite clinicamente evidente (52).

No estudo realizado por Burgers et al., foi demonstrado que existem diferenças fenotípicas na fase sintomática da doença, que precede o desenvolvimento da mesma, entre indivíduos ACPA<sup>+</sup> e ACPA-negativo (ACPA<sup>-</sup>) (47). Embora seja suposto que existam diferenças nos processos biológicos subjacentes, a apresentação clínica da AR ACPA<sup>+</sup> e ACPA<sup>-</sup>, no momento do diagnóstico, é idêntica (47). Na AR ACPA<sup>+</sup> existe uma fase, na presença ou não de sintomas, na qual os Acs antecedem a fase de AR clínica (47). Quanto à AR ACPA<sup>-</sup>, recentemente, surgiram evidências que afirmam a existência de uma fase pré-artrite sintomática, onde pode estar presente inflamação subclínica (47).

Após o aparecimento dos sintomas, pode levar algum tempo (semanas, meses e por vezes alguns anos) para o desenvolvimento da patologia, sendo que alguns pacientes podem passar por uma fase, até que cumpram os critérios para a AR, denominada “artrite não classificada” (53).

### 2.1.3- Diagnóstico

O diagnóstico da AR é, sobretudo, clínico, sendo necessárias investigações para avaliar e excluir outros diagnósticos possíveis (2)(56). O diagnóstico deve ser realizado o mais cedo possível, por forma a iniciar rapidamente o tratamento, uma vez que vários estudos vêm a demonstrar que o período inicial da doença é uma oportunidade única para intervir no progresso da doença (2)(57). O uso desta estratégia antes que os pacientes desenvolvam dano articular permanente e incapacidade funcional é crucial para uma melhoria dos resultados (58).

Todavia, o diagnóstico precoce desta patologia continua a ser um desafio para os médicos (59). Além disso, não existe um teste específico, capaz de identificar com certeza, a presença desta doença (59). Deste modo, o diagnóstico baseia-se num espectro de características clínicas, biológicas e radiográficas e, embora este último seja muito específico quando se observam erosões típicas, estas não estão presentes numa fase inicial da doença (59)(60)(61)(62).

Dos parâmetros laboratoriais fazem parte autoanticorpos e reagentes de fase aguda (ou marcadores inflamatórios), como o anticorpo anti-peptído citrulinado cíclico (anti-CCP, do inglês anti-Cyclic Citrullinated Peptide), o FR, a PCR e a ESR (ou velocidade de hemossedimentação- VHS) (60). A deteção em simultâneo dos parâmetros referidos é útil na confirmação do diagnóstico de AR (61). Quanto aos exames radiográficos, até então recorre-se à Radiografia Convencional (RC) na prática clínica diária, como técnica de imagem padrão para detetar e registar as lesões articulares, apesar da sua baixa sensibilidade comparativamente a outras técnicas de imagem, como a RM e a ultrassonografia (US) (63).

#### 2.1.3.1- Parâmetros laboratoriais

##### 2.1.3.1.1-Autoanticorpos

A AR é considerada uma DA devido à presença de autoanticorpos, como o FR e o ACPA (testado como anti-CCP), que podem estar presentes muitos anos antes da manifestação clínica da doença (1)(64)(65). Isto sugere que a desregulação do sistema

imunológico pode ocorrer muito tempo antes da doença sintomática, isto é, do aparecimento dos sintomas e, como tal, esse período pode ser denominado “pré-AR” (64)(66)(65). Posto isto, o FR e o ACPA são autoanticorpos úteis como marcadores sorológicos para diagnosticar a patologia entre pacientes com artrite inicial (59)(58)(29).

Existem estudos que afirmam que a sensibilidade do FR e do ACPA, para o diagnóstico da patologia é semelhante (aproximadamente 67%), porém outros afirmam que o ACPA apresenta maior sensibilidade (67)(58)(68). Quanto à especificidade, é o ACPA que se destaca, apresentando uma especificidade de 95%, ao passo que o FR apresenta 85% (68)(69)(58)(67).

Ambos têm o mesmo valor nos critérios de classificação ACR/EULAR 2010, para a AR e apresentam um impacto significativo quer no diagnóstico, quer no prognóstico da doença (58)(59). Ou seja, estes autoanticorpos desempenham um papel importante no diagnóstico e no risco de persistência e erosão (59). Assim sendo, na prática clínica, torna-se mais difícil iniciar um DMARD na sua ausência (59). Porém, o paciente pode apresentar AR erosiva sem a presença destes autoanticorpos (59). Cerca de 20-30% dos doentes com AR não têm nem ACPA nem FR e, por isso, estes pacientes são referidos como tendo AR “soronegativa” (59).

Os ACPAs ligam-se a proteínas que contêm o aminoácido (aa) citrulina, obtido por um processo enzimático, facilitado pelas proteínas arginina desaminase (PAD, do inglês Protein-Arginine Deiminase) (69). São altamente específicos para a AR e têm um bom valor preditivo para a patologia em pacientes com artrite inicial, estando relacionados com a progressão radiográfica na AR inicial (70)(59). Deste modo, ajudam a prever se haverá ou não progressão erosiva da patologia, o que os torna úteis como gestores da terapêutica mais adequada (64). Além disso, foi sugerido que a deteção de anti-CCP é clinicamente útil para diferenciar a AR de outras patologias reumáticas (71). O teste em simultâneo destes autoanticorpos pode ser mais benéfico do que testá-los isoladamente, para rejeitar o diagnóstico de AR (71). Somente em um terço dos casos soronegativos os pacientes apresentam anti-CCP (71).

O FR foi o primeiro Ac a ser descoberto na AR e é um Ac que atua contra a porção Fc da IgG (67)(69). Até ao final dos anos 90 foi dos poucos parâmetros com valor no cenário clínico, que formou a base da estratificação de AR positiva vs negativa

e permitia identificar os pacientes que tinham maior probabilidade de progredir para a fase erosiva da doença, contendo ou não características extracelulares (37). Este é menos específico, uma vez que pode estar presente em controles saudáveis (em até 5% da população saudável) e em pacientes com outras DRs [como a síndrome de Sjögren, Lupus Eritematoso Sistémico (LES) e crioglobulinemia], bem como em doenças infecciosas e neoplasias agudas, o que influencia o seu uso no diagnóstico da AR (69)(37). Portanto, no geral, o mesmo não é importante na monitorização das respostas à terapia (37).

O estudo realizado por Katchamart et al., com o objetivo de analisar o estado sorológico e a progressão da doença, em pacientes com a patologia, demonstrou que os pacientes que apresentavam ambos os autoanticorpos exibiam cursos clínicos mais severos e agressivos ao passo que, aqueles que eram soropositivos apenas para um deles e os que não apresentavam qualquer autoanticorpo, tiveram um curso intermediário e modesto, respetivamente (58).

#### 2.1.3.1.1.1- ACPA-positivo *versus* ACPA-negativo

A AR é uma patologia heterogénea e pode ser dividida em 2 subtipos de acordo com a presença ou ausência de ACPA, denominados de AR ACPA<sup>+</sup> e AR ACPA<sup>-</sup>, respetivamente (72)(73). Este Ac surge em locais específicos através do estímulo provocado por fatores ambientais (tabagismo e infeção) e predisposição genética (*HLA-DRB1*, *PTPN22*, entre outros) (74)(75). Sabe-se que os fatores de risco diferem entre pacientes com AR ACPA<sup>+</sup> e AR ACPA<sup>-</sup>, sendo que a maioria se encontra predominantemente associada à AR ACPA<sup>+</sup>, o que sugere que pode haver diferenças na resposta ao tratamento (72)(47).

Doentes com AR ACPA<sup>+</sup> apresentam um pior prognóstico, com taxas mais elevadas de dano erosivo (72). Todavia, não só é considerada como um fator prognóstico prejudicial para complicações extra-articulares sistémicas, como também para lesões articulares (74). Concentrações elevadas deste Ac, para além de indicarem positividade para o ACPA, significam também, uma progressão radiográfica mais rápida da doença, maior gravidade, bem como maior perda óssea (68).

O estudo realizado por Grosse et al. afirma que pacientes com AR ACPA<sup>+</sup> têm maior probabilidade de desenvolver doença erosiva em comparação com pacientes AR ACPA<sup>-</sup>, comprovado por RC e US, o que já foi comprovado por outros autores para a RC (74).

Squibb et al. realizaram um estudo cujo objetivo era analisar a associação entre os níveis de ACPA e o uso de recursos, inclusive as hospitalizações e a utilização de equipamentos médicos duráveis (DME, do inglês Durable Medical Equipment) (como bengalas, cadeiras de rodas, entre outros) (68). Deste, concluíram, que um aumento do benefício clínico e um decréscimo na utilização de cuidados de saúde acontece quando da redução dos níveis de ACPA (68). Como já referido, este Ac pode preceder o início dos sintomas, até 10 anos e a sua presença contribui para um aumento do risco de vir a desenvolver a patologia (75).

A vimentina citrulinada, um dos Ag alvo do ACPA, encontra-se altamente expressa nas células da linhagem de monócitos e/ou macrófagos e quando da diferenciação dos osteoclastos (OCs), a sua expressão aumenta ainda mais (75). A expressão desta proteína nas células da linhagem dos OCs resulta da indução pela PAD2 (75). A vimentina, apenas na forma citrulinada, está presente na superfície dos precursores dos OCs, o que facilita a ligação de Acs (75).

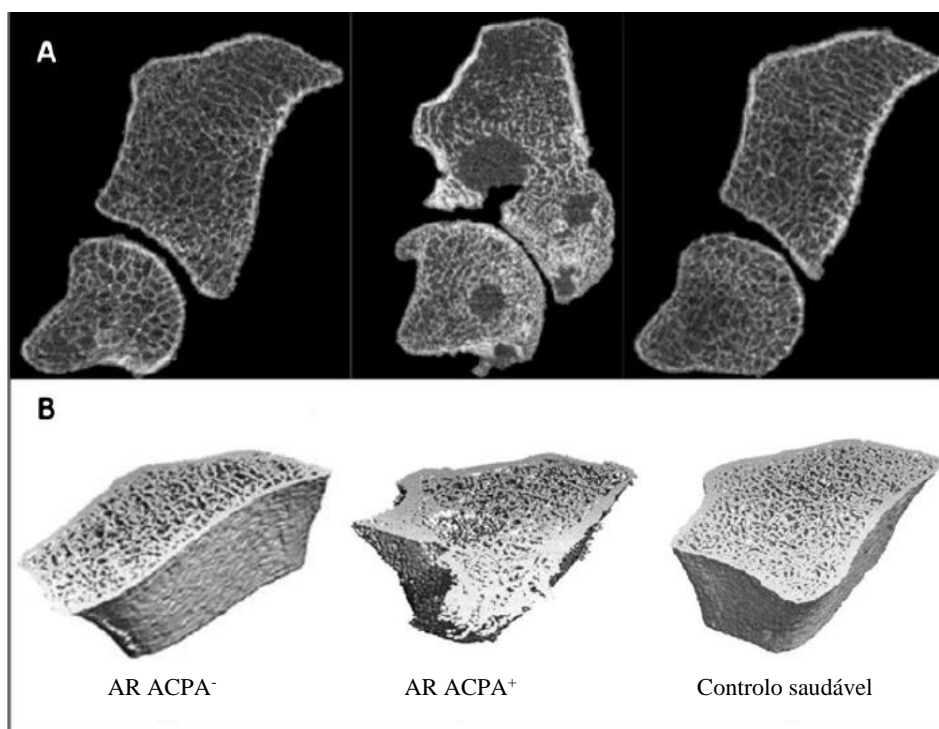
A ligação dos ACPAs à vimentina presente nos OCs, promove a expressão e a libertação do TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ), que se julga ser o responsável pela diferenciação dos monócitos em precursores de OCs, bem como em OCs maduros (76). O ACPA funciona como um promotor da diferenciação dos precursores de OCs em OCs, no humano, bem como aumenta o número dos mesmos em ratos (76)(75). Além disso, quando injetado em ratos principia a perda óssea (76)(75).

Foi realizado um estudo em que se verificou que indivíduos ACPA<sup>+</sup> sem sinais de artralgia ou artrite inflamatória apresentavam sinais de perda óssea, em comparação aos controles saudáveis sem ACPA (75). Portanto, pacientes com ACPA<sup>+</sup>, mesmo antes do início doença, apresentam erosão óssea (75).

O fenótipo da AR, assim como a sua apresentação clínica é definida pelo ACPA (Figura 2.2) (75). Este incita a ocorrência de erosão óssea e osteoporose secundária com perda da Densidade Mineral Óssea (DMO), bem como a alteração da microestrutura do osso e, como tal, a perda óssea no início do processo da patologia ocorre não só a nível

local, como também sistémico (75). Isto apoia o facto de a AR ACPA<sup>+</sup> ser considerada uma entidade distinta da doença (75).

*Figura 2.2- Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução do raio distal. Do lado esquerdo, de uma mulher com AR sem ACPA (ACPA<sup>-</sup>); no meio, de uma paciente do sexo feminino ACPA<sup>+</sup>; do lado direito, de uma paciente da mesma idade, saudável. Adaptado de (75).*



Portanto, a AR ACPA<sup>+</sup> e a AR ACPA<sup>-</sup> são vistas como um subconjunto de doenças distintas com diferenças na etiopatologia e estes autoanticorpos são considerados como um dos fatores risco mais fortes para a destruição óssea (47)(76).

#### 2.1.3.1.2- Reagentes de fase aguda

Habitualmente, recorre-se aos reagentes de fase aguda, a PCR e a VHS, para avaliar/acompanhar a atividade da doença e a resposta à medicação (33)(29)(77). Estes são parâmetros analíticos que transpõem o estado de inflamação (2).

A VHS é o índice de fase aguda mais antigo e foi aplicada como teste laboratorial por Edmund Biernacki (78). Embora tenha sido considerado como o teste

mais utilizado do século XX, atualmente, a sua utilidade clínica é posta em causa, contrariamente à PCR, bastante aplicada (78). Apesar de pouco utilizado nos diagnósticos modernos, o teste da VHS ainda é utilizado na área da reumatologia (78).

A ESR está relacionada com o número de glóbulos vermelhos (RBCs, do inglês Red Blood Cells) e viscosidade plasmática e, por sua vez, este último que não é mais do que a razão entre a albumina e a globulina é, provavelmente, o fator que mais afeta a VHS (78). Um outro fator que afeta a VHS é o nível sérico de fibrinogénio (78).

O teste da ESR mede a taxa na qual os RBCs, ou eritrócitos, numa amostra de sangue total, caem (ou seja, sedimentam) no fundo do tubo de Westergren (79). Em pessoas com doenças inflamatórias, como infeções, cancro ou DAs, geralmente, os eritrócitos sedimentam a uma taxa mais rápida (79). Nestas condições existe um aumento no número de proteínas no sangue e, este aumento faz com que os RBCs se aglutinem e se fixem mais rapidamente (79).

Em 1930, William et al. descobriram a PCR (78). Nas duas últimas décadas o teste desta proteína voltou a ganhar ênfase ao ter sido descoberto o seu papel na inflamação na doença aterosclerótica (78). A PCR é uma das proteínas de fase aguda que faz parte da família de proteínas designada pentraxinas (80)(78). Esta contribui para a opsonização, que não é mais do que facilitar o processo de fagocitose, revestindo as partículas a opsonizar, sobretudo, as bactérias e contribui também para a fagocitose e ativação do complemento, pela via clássica (80)(78). Forma-se no decorrer de reações inflamatórias, principalmente no fígado, como resultado de estímulos provocados por citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (80)(78).

As DRs caracterizam-se, frequentemente, pela presença de características clínicas não específicas, que facilmente são confundidas ou coincidem com patologias não-reumáticas, como é o caso das infeções ou doenças malignas (77). Em pacientes nestas condições, isto é, com apresentações clínicas inespecíficas, a sorologia pode ser vantajosa, embora não se traduza necessariamente num diagnóstico definido (77).

Num estudo realizado por Bitik et al., observaram-se casos que tinham níveis séricos elevados de reagentes de fase aguda e características inespecíficas, o que levou a uma avaliação adicional devido à possibilidade de se tratar de um diagnóstico não-reumatológico (77). Na população em estudo, crises de DR, DR recentemente

diagnosticada, infecção e malignidade eram as principais causas de níveis elevados de VHS e PCR (77).

Portanto, ainda que exista um diagnóstico prévio de DR, se os níveis da PCR estiverem elevados e o paciente apresentar características clínicas inespecíficas, tal deve levantar suspeita acerca da presença de um diagnóstico não-reumatológico (77).

Estes marcadores laboratoriais são inespecíficos, uma vez que são influenciados por vários fatores, traduzindo apenas o estado inflamatório de curto prazo, porém são importantes no auxílio do diagnóstico da doença (60)(61). Do exposto, é possível concluir que é necessário procurar novos marcadores para avaliação da atividade da doença (60).

Entre estes marcadores de resposta inflamatória aguda sistêmica, os níveis de VHS são menos específicos para a patologia, quando comparados com os da PCR, uma vez que esta última está fortemente correlacionada com níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias (como a IL-6 e TNF- $\alpha$ ) (29).

Em pacientes com AR os níveis de PCR e VHS podem estar elevados, aquando da inflamação ativa da articulação, porém cerca de 60% dos pacientes com AR ativa apresentam valores normais, o que os pode tornar insensíveis e pouco confiáveis para avaliar a inflamação das articulações (56)(67)(81). Segundo a Sociedade Portuguesa de Reumatologia (SPR), estes parâmetros costumam estar elevados, embora possam também ser normais (2).

#### 2.1.3.2 - Exames radiográficos

Segundo a EULAR, o recurso a imagens deve ser feito quando houver alguma dúvida no diagnóstico da patologia (29). Para tal usam-se a RC, a US ou a RM, por forma a melhorar a certeza de um diagnóstico de AR, acima dos critérios clínicos (29). O exame clínico e as RCs podem não ter capacidade, isto é, podem não ser suficientemente precisos e sensíveis para detetar sinais precoces de inflamação das articulações, bem como danos estruturais (56).

Tipicamente, como avaliação radiográfica de primeira linha das articulações de pacientes com AR, utiliza-se a RC, principalmente pela sua reprodutibilidade e viabilidade na detecção de danos estruturais, porém a mesma apenas concede informação indireta sobre a inflamação sinovial, sendo insensível ao dano ósseo, bem como ao envolvimento inflamatório ósseo precoce (67)(82). Em doentes com AR inicial a RC pode ser normal, porém tal não descarta a presença de doença (67).

Uma vez que a RC não possibilita a detecção de alterações erosivas nos estágios iniciais da doença, surgiram outros métodos, como a US e a RM, que possibilitam uma melhoria na visualização precoce de erosões ósseas (83). Na avaliação da AR, tanto na pesquisa como na prática clínica, a RM e a US têm sido cada vez mais empregues, uma vez que podem fornecer informação sobre a patogénese (mais precisamente, sobre a inflamação articular), assim como identificar os principais aspetos patológicos, ainda antes de poderem ser visualizados pela RC (82).

A RM e a US são capazes de prever a progressão da doença, de AR inflamatória indiferenciada para AR clínica e, uma vez que estas técnicas têm um papel superior na detecção da inflamação articular, as mesmas devem ser tidas em conta aquando de uma avaliação mais precisa da inflamação (29).

A US consegue detetar sinovite ainda numa fase inicial e reduzida, mesmo em articulações clinicamente não afetadas (56). No início da doença, a RM pode mostrar sinovite e erosões, ainda antes delas serem detetadas nas RCs (56). A US possui como vantagens a ausência de irradiação, grande disponibilidade, abordagem dinâmica, rapidez, baixo custo e reprodutibilidade, porém depende do operador (83). Quanto à RM, esta permite detetar e, por vezes, quantificar as alterações sinoviais, bem como providenciar alta sensibilidade para detetar alterações inflamatórias nas articulações (83)(84). No entanto, é um método caro e com disponibilidade reduzida (83)(84).

Alguns meses após o início dos sintomas, as erosões ósseas provocadas pela patologia podem ser visíveis nas margens laterais da articulação, usualmente encontradas nas pequenas articulações das mãos e dos pés (85).

#### 2.1.4- Sintomas/Queixas

Geralmente, a doença começa como uma poliartrite, ou seja, com mais de 4 articulações edemaciadas e dolorosas, de início progressivo, e envolve as articulações de forma simétrica, isto é, dos 2 lados do corpo, especialmente as pequenas articulações (2)(29)(85).

Qualquer articulação dotada de membrana sinovial pode ser afetada, todavia as mais comumente afetadas são as articulações interfalângicas proximais (PIP, proximal interphalangeal) e MCPs das mãos e pulsos, seguidas pelas articulações metatarsofalângicas (MTP, do inglês metatarsophalangeal) dos pés, tornozelos e ombros (2)(33)(36). Com a progressão da doença, outras articulações podem ser atingidas, como as dos cotovelos, ancas, joelhos e coluna cervical (2)(85).

Pacientes com AR apresentam comumente dor e rigidez em várias articulações, sendo a rigidez (sensação de bloqueio dos movimentos) mais comum no período matinal ou após períodos de repouso e dura cerca de mais de 1 hora (33)(36)(2)(67).

Sensibilidade dos locais articulares, espessamento sinovial e/ou derrame articular (isto é, acumulação de líquido numa articulação do corpo) estão presentes no exame físico de doentes com a patologia (36)(86). Além disso pode ainda ser visível o edema do pannus, como demonstrado na Figura 2.3 (33).

*Figura 2.3- Imagem de um individuo com AR de início recente, que demonstra o edema nas articulações interfalângicas e metacarpofalângicas proximais, mais salientes na mão direita. Adaptado de (33).*

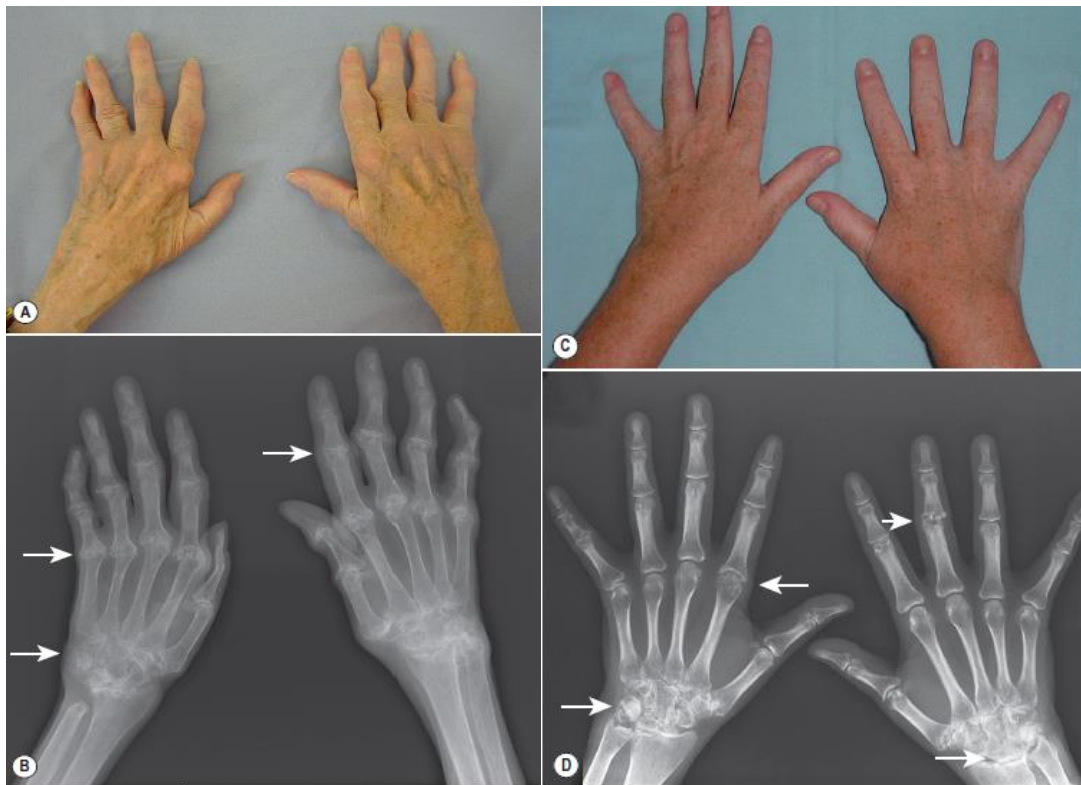


No que respeita à capacidade limitante da doença, a mobilidade articular, a função muscular, bem como a dificuldade em andar e a destreza são as estruturas/funções mais comumente afetadas (85).

Como se pode ver na Figura 2.4, do lado esquerdo, a AR crónica, grave e erosiva, que não responde ao tratamento, visualizando-se também o edema articular e deformidades (37). Já no lado direito, a doença erosiva já se encontra atenuada pela terapia combinada e biológica (37).

Considerada como uma patologia sistémica, é comum os pacientes apresentarem manifestações extra-articulares (67). Quando os pacientes estão numa fase ativa da doença, pode surgir fadiga, perda de peso e febre (33).

Figura 2.4- Fotomicrografias e radiografias da mão de um utente com AR. Adaptado de (37).



A Tabela 2.6 compila as manifestações extra-articulares da AR (33)(67)(86).

Tabela 2.6- Manifestações extra-articulares da AR. Adaptado de (33)(67)(86).

Manifestações extra-articulares da AR		
Manifestação		
Cutânea	Nódulos reumatoides	Situados nas superfícies extensoras das articulações, são a característica cutânea mais comum da AR.
	Vasculite	Rara, mas tem um mau prognóstico. Varia de púrpura a ulceração e infarto. Surge com a AR grave (isto é, doença erosiva, deformadora e soropositiva).
Oftalmológica	Ceratoconjuntivite seca (ou olho seco)	É a mais frequente. Pelo menos 10% dos doentes a apresenta. É comum aparecer juntamente com xerostomia na síndrome de Sjögren secundária.
	Episclerite e esclerite	Inflamação da camada superficial da esclera e da própria esclera, respetivamente. Manifesta-se como olhos vermelhos e dolorosos. Prevalência inferior a 1%.
	Ceratite ulcerativa periférica	Extensão da inflamação da esclera, que pode culminar na perfuração da câmara anterior.
Cardíaca	Pericardite	30-50% dos pacientes apresentam-na na autópsia.
	Aterosclerose acelerada	Considerada a principal causa de morte em doentes com AR.
Hematológica	Amiloidose	Causada pela inflamação crónica.
	Síndrome de Felty	Esplenomegalia, neutropenia e trombocitopenia.
Pulmonar	Síndrome de Caplan	Nódulos e pneumoconiose (por exemplo, em mineiros de carvão)
	Doença Pulmonar intersticial	Pode parecer bronquiolite obliterante com pneumonia em organização, fibrose pulmonar idiopática. O paciente pode ter hipertensão arterial pulmonar.
	Derrames pleurais	Vulgarmente são exsudatos com contagem mista de células e alta concentração de proteínas, com nível de glucose muito baixo.
	Nódulos pulmonares	Usualmente são assintomáticos e encontram-se presentes em indivíduos FR <sup>+</sup> com nódulos noutros locais.
Sistema Nervoso	Neuropatia	Síndrome do túnel do carpo é o aprisionamento nervoso mais comum e caracteriza-se por perda sensorial ou parestesia na distribuição do nervo mediano.
	Mielopatia cervical	Instabilidade ou subluxação atlanto-occipital, pode ser o motivo dos sintomas que alteram de dor radicular e parestesia a mielopatia e morte.

### 2.1.5- Etiologia

A AR é uma DA e, como tal, num doente com esta patologia, o seu sistema imunológico não está a funcionar de forma adequada, o que leva a que produtos do sistema imunológico reajam contra os tecidos do próprio doente (2). Desta forma, em vez de proteger a articulação, o sistema imunológico ataca-a, o que resulta no desenvolvimento da AR (5)(4). Até ao momento não se conhece a causa da desregulação do sistema imunológico (2). Existem autores que referem que a AR não é um distúrbio genético, mas há alguns pesquisadores que acreditam que algumas pessoas têm genes que as tornam vulneráveis à patologia (4). No entanto, essas pessoas nem sempre desenvolvem AR, exceto se os genes forem ativados por exemplo, por infeções ou fatores ambientais (4). Por outro lado, há quem acredite que a AR é uma doença congénita, mas que ser portador de genes não torna as pessoas vulneráveis à patologia e, da mesma forma, isto é, por infeções ou fatores ambientais, os genes podem ser ativados (5). Estudos científicos insinuam que a doença é causada pela interação de fatores de risco com a existência de predisposição genética (2)(87).

Recentemente, tornou-se claro que o aparecimento da AR deve-se a componentes genéticos e epigenéticos, e que o ambiente também apresenta um papel importante, como o fumo do tabaco, exposição ao pó e, sobretudo, o microbioma, que também representa um ambiente “interno” (88).

Estudos epidemiológicos destacam a importância na patogénese e desenvolvimento de DAs, o envolvimento de fatores não genéticos como estímulos ambientais, uma vez que a taxa de concordância de gémeos monozigóticos (MZ) com AR é baixa (89).

Os estudos que envolvem gémeos podem ser uma ferramenta útil para estimar a proporção de um gene na origem de uma doença (90). Gémeos MZ são geneticamente idênticos, enquanto que os gémeos dizigóticos (DZ) partilham metade dos seus genes (90). Assim sendo, se os gémeos MZ apresentarem uma taxa de concordância mais alta para uma dada doença do que os gémeos DZ, isso significa que os fatores genéticos contribuem para a origem da mesma, supondo que o efeito do ambiente intrauterino é o mesmo para cada gémeo (90).

Em suma, a etiologia da AR permanece desconhecida e apresenta uma elevada complexidade, todavia acredita-se que a genética, o sexo, a idade, o tabagismo e a infecção estão entre os fatores que influenciam a suscetibilidade à AR (91)(92).

#### 2.1.5.1- Fatores genéticos

A AR é uma doença inflamatória autoimune, que resulta da interação entre a constituição genética e fatores ambientais (87)(93). Estima-se que a probabilidade de herdar esta patologia seja cerca de 60% (93). Dados de estudos familiares e de gémeos sugerem que 60% da suscetibilidade à patologia deve-se a fatores genéticos (94). No geral, 30 a 50% da suscetibilidade à AR deve-se ao HLA, considerado o fator de risco genético mais importante (93)(95). Os genes *HLA* foram os primeiros a serem relacionados à suscetibilidade à AR (96).

Os alelos do epítopo compartilhado (HLA-SE, SE do inglês Shared Epitope) e o polimorfismo da PTPN22 1858C/T, até então, são considerados os fatores genéticos mais fortes para a AR, e demonstraram estar presentes apenas para a AR ACPA<sup>+</sup> (97).

##### 2.1.5.1.1- Fator de risco genético HLA

O complexo major de histocompatibilidade (MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) foi descoberto em consequência de estudos, inicialmente dirigidos por Peter Gorer e, posteriormente, por George Snell, sobre uma região cromossômica que albergava genes que influenciavam o produto da rejeição de transplantes entre ratinhos de estirpes diferentes (98). Cruzamentos entre estirpes diferentes possibilitaram a determinação da existência de um *locus* com um papel importante, isto é, maioritário, na rejeição, e de outros *loci* de menor influência (98). Este grupo de genes foi designado como *locus* de histocompatibilidade pelo facto de estar envolvido na compatibilidade de tecidos (98). MHC foi a designação adotada para o *locus* dominante, enquanto que os outros se designavam complexo menor de histocompatibilidade (98).

Mais tarde, foram realizados estudos de transplantação de células (98). Estes mostraram que genes do MHC codificavam para glicoproteínas polimórficas de superfície que eram diferentes entre estirpes de ratinhos, responsáveis por incitar a produção de Acs contra Ags alogênicos, isto é, aloanticorpos (98).

Estudos semelhantes, em humanos, permitiram identificar e caracterizar produtos génicos do MHC, localizados na superfície de leucócitos circulantes (98). Isto permitiu denominar as moléculas de MHC humanas de HLAs (98). Em resultado destes estudos, definiram-se dois grandes grupos de genes de MHC: os genes de MHC classes I e II, presentes em todas as espécies de vertebrados (98). Os primeiros estão presentes em quase todas as células com núcleo, enquanto que os segundos se encontram principalmente nos linfócitos B, monócitos/macrófagos e células dendríticas (DCs, do inglês Dendritic Cells) (98).

Tanto as moléculas de MHC classe I como as de classe II apresentam uma expressão codominante, ou seja, as nossas células apresentam os alelos herdados de ambos os progenitores (99). A combinação de moléculas das classes I e II expressas por um indivíduo constitui o haplótipo ou tipo de HLA (99).

Pode-se considerar que as moléculas de MHC têm uma função pleiotrópica, ou seja, funções variadas (99). No entanto, o seu envolvimento em respostas imunológicas é a sua função mais conhecida e estudada (99). O MHC codifica muitos genes que estão envolvidos no desenvolvimento de mais de cem doenças diferentes, particularmente DAs e, por isso, apresenta uma grande importância biomédica (99).

#### 2.1.5.1.1.1- Organização génica do MHC

Os genes codificados no MHC são os principais responsáveis pela imunidade adaptativa (100). O MHC humano divide-se em três regiões principais, HLA classe I, II e III, sendo os genes *HLA* das classes I e II os mais polimórficos (100)(99). Este complexo encontra-se no braço curto do cromossoma 6 em humanos, e no cromossoma 17 em ratinhos (100)(99).

As moléculas HLA classe I são estruturas triméricas, que apresentam uma cadeia polipeptídica pesada de 44-49kDa designada  $\alpha$ , com três domínios extracelulares ( $\alpha$ 1,

$\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ) e uma cadeia polipeptídica leve denominada de beta( $\beta$ )<sub>2</sub>-microglobulina de 12kDa (kilodaltons) (101)(100). Os domínios aminoterminais,  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , são altamente polimórficos e interagem de modo a formar uma cavidade onde se liga o péptido, com oito a onze aas, processado endogenamente (101)(100).

Nos humanos, as cadeias  $\alpha$  são codificadas por genes do cluster MHC-I: moléculas de MHC-I clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C), moléculas de MHC-I não clássicas (HLA-E, HLA-F HLA-G, MICA, MICB e 17 pseudogenes) (102). As moléculas de MHC-I clássicas são muito polimórficas, contrariamente às outras (102). O gene da cadeia leve,  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulina, é codificado no cromossoma 15, no ser humano, e no cromossoma 2, no ratinho, ou seja, fora do MHC (102).

Relativamente às moléculas HLA classe II, estas são estruturas triméricas, constituídas por 2 cadeias polipeptídicas pesadas, uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ , de 33-35kDa e 26-28kDa, respetivamente (102)(100). Cada uma delas contém 2 domínios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ), sendo os domínios aminoterminais,  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , responsáveis pela formação de uma cavidade onde se liga o péptido, de 12 a 30 aas (102)(100). Tal como nas moléculas de MHC-I, os resíduos polimórficos estão sobre e em volta da cavidade onde se liga o péptido, em  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  (103).

Nos humanos, tanto as cadeias  $\alpha$  como as  $\beta$ , das moléculas de MHC classe II clássicas (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR e alguns pseudogenes) e MHC classe II não-clássicas (HLA-DM e HLA-DO) são codificadas por genes do cluster MHC-II (104).

Como referido anteriormente, as moléculas de MHC-I clássicas são constitutivamente expressas por virtualmente todas as células com núcleo, ao passo que as moléculas de MHC-II clássicas são expressas de um modo mais restrito, sendo expressas de modo constitutivo apenas por células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês, Antigen Presenting Cells), das quais fazem parte células B, monócitos, macrófagos e DCs, bem como pelas células do timo (104)(100). Os linfócitos T apenas apresentam moléculas MHC-II quando estão ativados ou durante estados inflamatórios (104)(100).

Posto isto, as moléculas MHC classe I e classe II têm como função principal a apresentação de péptidos na superfície celular, que vão ser reconhecidos pelos linfócitos T através do seu recetor- TCR (do inglês, T Cell Receptor) (105). A origem dos péptidos é diferente entre estas moléculas(105). Os péptidos apresentados pelas

moléculas de MHC-I tem origem no citoplasma, ao passo que os das moléculas de MHC-II tem origem nos endolisossomas (105).

Assim sendo, as moléculas de MHC podem apresentar diversos péptidos de origem diferente, não só os péptidos próprios como péptidos provenientes de proteínas não próprias, como, por exemplo, de agentes infecciosos, vírus e bactérias (105).

O papel dos fatores genéticos como determinantes na suscetibilidade às DAs tem sido demonstrado através de estudos epidemiológicos, com base em estudos de imunogenética e de algumas observações clínicas (106). Existem casos de DAs, mais raros, associados à mutação de um único gene, porém, a maioria será multigénica (106). No caso da AR, vários genes contribuem para a suscetibilidade e gravidade da mesma (107). Os genes do MHC, principalmente, os de classe II, que estão envolvidos na apresentação antigénica aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, parecem conferir muito maior risco (106).

#### 2.1.5.1.1.2- MHC e a artrite reumatoide

O conhecimento acerca da influência dos genes *HLA-DRB1* no desenvolvimento da AR data de 1976, marcado pela observação de que linfócitos de doentes com AR não se estimulam em culturas mistas de linfócitos (96). Desde então, os genes *HLA-DRB1* e os seus produtos foram determinados, bem como a sua função, apresentação de péptidos às células T CD4<sup>+</sup>, foi identificada (96).

Entre mais de 100 *loci* de genes identificados para a AR, os genótipos *HLA-DRB1* são considerados o fator de risco genético mais relevante, isto é, exercem a maior influência hereditária na suscetibilidade à doença (108)(109)(92).

Tal refere-se, particularmente, aos alelos HLA-DRB1 que codificam uma sequência de aas comum denominada SE, uma sequência que abrange os aas 70 a 74 (QKRAA, QRRAA e RRRAA), localizada na terceira região hipervariável da cadeia DRβ, que explica uma grande parte da predisposição genética à AR (108)(109)(96)(95)(92).

Mais de 450 alelos do gene *HLA-DRB1* foram até então detetados em seres humanos (110). Tal deve-se ao facto da região HLA acolher alguns dos locais mais polimórficos do genoma humano (110).

Contrariamente ao que acontece nos outros polimorfismos, que são encontrados na sua maioria dentro do local de ligação ao Ag, no HLA-DR os polimorfismos encontram-se restringidos à cadeia DR $\beta$  (genes *DRB1,3,4 e 5*), sendo a cadeia DR $\alpha$  sobretudo monomórfica (107).

Os alelos HLA-DRB1 que codificam o SE (DRB1\*01, \*04,\*10 e \*14) estão relacionados com a gravidade estrutural da AR (93). Recentemente, estes alelos foram relacionados à produção de autoanticorpos anti-CCP (93). Em contrapartida, os génotipos negativos para o SE (nomeadamente, DRB1\*11 e \*13) fornecem proteção contra a susceptibilidade à doença (93).

Roark et al. afirmaram que os alelos HLA-DRB1 predominantes, associados à AR, são os DRB1\*04:01, \*04:04 e \*04:05 e, em menor grau, os DRB1\*10:01 e \*01:01, e que os mesmos conferem suscetibilidade por meio do SE (111). Acredita-se que os aas nas posições 70 a 74 do mesmo medeiam a apresentação de péptidos artritogénicos a células T específicas, o que causa a doença (111).

A presença de ACPA nos soros, para os quais 70-75% de todos os pacientes são soropositivos, é uma das características da AR (96)(112). Sabe-se que um dos principais fatores de risco herdados que contribuem para a AR ACPA<sup>+</sup> são os loci HLA classe II, nomeadamente, o HLA-DRB1, responsável por codificar as moléculas apresentadores de Ag, HLA classe II (112)(111).

Os ACPAs têm como alvo proteínas que foram submetidas a citrulinização, um mecanismo pós-traducional (PTM, do inglês Post-Translational Mechanism) em que há conversão de arginina (Arg) em citrulina, levado a cabo por uma família de enzimas conhecidas como PADs (96)(112). Este processo está intimamente relacionado com a inflamação da articulação sinovial, característica de doentes com AR (112).

Tendo em conta a elevada taxa de ACPAs em pacientes com AR, e a presença de neo-auto-antígenos obtidos por citrulinização, consideram-se esses Ags como os principais geradores da resposta autoimune por parte das células T CD4<sup>+</sup> na AR ACPA<sup>+</sup> (112).

Foi realizado um estudo que demonstrou que a associação entre o MHC e a AR é melhor esclarecida por 5 aas, 3 dos quais no HLA-DRB1 e 1 no HLA-B e HLA-DPB1, sendo que 2 deles são semelhantes como os do SE (92). Por sua vez, a valina/lisina/alanina nas posições 11/71/74, em resultado dos 16 haplótipos DRB1, é a mais fortemente associada à AR, correspondendo ao alelo DRB1\*04:01, uma associação perfeitamente fundamentada (92).

Em pacientes com AR HLA-DR4 (DRA1\*01:01/HLA-DRB1\*04:01), bem como em ratinhos transgênicos “preparados” com autoantígenos citrulinados (DRA1\*01:01/HLADR B1 04:01), são encontradas células T CD4<sup>+</sup> específicas para Ags com citrulina (112). Por outro lado, verifica-se um aumento de células T auxiliares (Th, do inglês T helper)1 e Th17 específicas para a citrulina em pacientes com AR HLA-DRB1\*04:01, assim como se observa a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta aos autoantígenos citrulinados, produzidas por células T CD4<sup>+</sup> (112).

Os autoantígenos primários associados à AR podem ter como local de origem o local da doença, ou seja, a cartilagem articular e os fluidos sinoviais (112). Porém, também podem advir do plasma sanguíneo ou de tecidos mucosos adjacentes, suscetíveis à inflamação (112). Essas proteínas podem então sofrer PTMs durante vários processos fisiológicos, tais como infecções, apoptose e stress celular (112). Alguns dos autoantígenos citrulinados melhor caracterizados, que se ligam aos ACPAs, são colagênio tipo II,  $\alpha$ -enolase, fibrinogênio e vimentina (112).

O local de ligação ao Ag, da molécula HLA classe II, pode alojar péptidos que variam em comprimento, todavia, as principais bolsas que estão mais fortemente em contacto com o péptido alojado são as P1, P4, P6, P7 e P9, que podem albergar as cadeias laterais dos resíduos peptídicos 1, 4, 6, 7 e 9 (112).

A bolsa P4 dos alomorfos de alto risco associados ao HLA-DRB1 AR é definida pelo SE, de elevada prevalência (90%) em pacientes ACPA<sup>+</sup>(112)(113). Posteriormente foram realizados estudos de associação em todo o genoma (GWAS, do inglês Genome-Wide Association Study), que mostraram que 2 polimorfismos que codificam os resíduos nas posições 11 e 13 da cadeia  $\beta$ , na base da bolsa P4, também se associam à suscetibilidade à AR (112).

O SE situa-se numa região da cadeia DR $\beta$  e apresenta uma carga muito positiva, o que vai ter efeito na especificidade do aa P4 do ligante que está ligado (113). Assim

sendo, é espectável que o SE forme uma ligação com um aa carregado negativamente ou não polar nesta região (113).

O processo de citrulinização resulta na substituição dos grupos amino da cadeia lateral carregada da Arg, por um grupo não carregado, o grupo carbonilo, o que demonstrou ser a permissiva para a ligação do epítipo do péptido vimentina humano a moléculas HLA-DR SE-positivo (SE<sup>+</sup>), pela maior afinidade a P4 (113).

A frequência alélica associada à patologia é diferente entre populações distintas (110). A maior parte das associações do HLA-DRB1 com a AR contém o SE (110). Os alelos HLA-DRB1 SE mais comuns, que conferem suscetibilidade (isto é, >5% da frequência da população) incluem \*01:01, \*04:01 e \*04:04 em indivíduos de ascendência europeia, ao passo que, em indivíduos de ascendência asiática o mais comum é \*04:05 (110).

Recentemente, realizou-se uma meta-análise que teve por objetivo avaliar as características de DAs geneticamente associadas na América Latina (110). A mesma permitiu encontrar 2 alelos, o DRB1\*04:05, associado à suscetibilidade à AR e outras DAs [como Diabetes Mellitus Tipo 1(DMT1) e hepatite autoimune] e o DRB1\*0401, que mostrou conferir risco de desenvolver AR e DMT1 (110).

Uma vez que existem pelo menos 2 classes de alelos HLA-DRB1 de risco, alto e moderado, a força de associação genética com a suscetibilidade à doença difere do alelo (110). De um modo geral, o alelo DRB1\*04:01 apresenta um nível de risco elevado, com um Risco Relativo (RR) de sensivelmente 3 (110). Ao passo que, os alelos DRB1\*01:01, DRB1\*04:04, DRB1\*10:01 e DRB1\*09:01 exibem um RR de cerca de 1,5, ou seja, moderado (110).

Do ponto de vista estatístico considera-se que a presença do SE esteja associada à AR (111). No entanto, vários estudos sugerem que a hipótese do SE não explica de todo a suscetibilidade à doença (111). Por exemplo, há uma hierarquia diferente entre os alelos DRB1 em relação à suscetibilidade à AR (111). Isto é, apesar da presença do SE podem observar-se diferenças significantes na suscetibilidade em pacientes com alelos DRB1\*04:01, \*04:03, \*04:04, \*04:05 e \*04:07 (111). Por outro lado, o DRB1\*01:01 está associado à AR, mas o DRB1\*01:02 não está, embora o epítipo QRRAA esteja presente em ambos (111). Tal propõe que a suscetibilidade à doença possa não ser explicada só com base nessa hipótese (111).

Desde 1987, que a associação da AR com alelos HLA-DRB1 SE<sup>+</sup> tem vindo a ser comprovada por diversos estudos (73). Porém, sugeriu-se que alelos HLA-DRB1 SE-negativo (SE<sup>-</sup>) fornecem proteção contra o desenvolvimento da patologia, embora a maior parte seja neutra (73). Até então foram propostos diversos modelos com o objetivo de prever se um determinado genótipo (isto é, ambos os genes presentes num indivíduo) será suscetível, protetor ou neutro para o desenvolvimento da doença (73).

No estudo realizado por Balandraud et al., calculou-se o risco de desenvolver a patologia de acordo com o genótipo *HLA-DRB1* individual (73). No que respeita ao risco de desenvolver AR ACPA<sup>+</sup> foi calculado o Odds Ratio (ORs) para 102 de 136 genótipos possíveis (73). As razões de probabilidade genotípica variaram de 28 (HLA-DRB1\*04:01/\*10) a 0,19 (HLA-DRB1\*03/\*03) (73).

Trinta genótipos (29%) apresentaram ORs claramente superiores a 1 e, por isso, foram considerados de “alto risco” (73). Destes 30, 18 contêm 1 e 10 contêm 2 alelos HLA-DRB1 associados à AR (73). HLA-DRB1\*07/\*16 e HLA-DRB1\*07/\*04:02 são os únicos que não contêm nenhum alelo (74). Quarenta e cinco (44%) foram considerados como “neutros” uma vez que apresentaram ORs não significativamente maiores que 1 (73). Por último, 27 (26%) apresentaram ORs claramente menores que 1 e, assim, foram considerados de “baixo risco” (73). Dos 27, 26 não contêm nenhum alelo associado à patologia (74).

O risco carregado pelo alelo associado à AR é entoado pelo segundo alelo no genótipo, tal como observado nos genótipos que contêm o SE, *HLA-DRB1\*04*, *HLA-DRB1\*04:01*, *HLA-DRB1\*01* (73). Por exemplo, os ORs associados aos genótipos HLA-DRB1\*04 SE variam de 13,4 (HLA-DRB1\*04SE/04:01) a 1 (HLA-DRB1\*04SE/08) (73).

Em suma, este estudo permitiu confirmar a associação clássica existente entre a AR e a presença de alelos HLA-DRB1 SE-positivo (SE<sup>+</sup>) (73). Sete alelos HLA-DRB1 estão associados à AR nesta população: HLA-DRB1\*04:01, HLA-DRB1\*04:04, HLA-DRB1\*04:05, HLA-DRB1\*04:08, HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*10, HLA-DRB1\*09. HLA-DRB1\*04:01, HLA-DRB1\*04:04, HLA-DRB1\*04:08 (73). Os mesmos são classicamente associados à AR em populações do norte e oeste da Europa (73). A associação positiva de HLA-DRB1\*09 com AR é menos comum, estando sobretudo presente em asiáticos e no Reino Unido (73).

Este estudo diz-nos que a presença de ambos os alelos HLA-DRB1 ditam o risco genotípico (73). Sugere, também, que os mesmos conferem suscetibilidade à patologia, mas com um “peso” diferente (73). O grupo de alelos denominado DRB1\*04 SE parece ser o mais forte, dado que quase sempre conferem suscetibilidade (73). Por outro lado, genótipos com *HLA-DRB1\*07*, *HLA-DRB1\*08*, *HLA-DRB1\*11*, *HLADRBI\*13*, *HLA-DRB1\*03* são sobretudo de baixo risco ou neutros (73).

Por outro lado, este estudo não abordou a temática da AR ACPA<sup>-</sup> e as suas associações com HLA-DRB1 (73). Todavia, um estudo em larga escala sugeriu que metade dos pacientes com AR ACPA<sup>-</sup> apresenta resultados positivos para o FR e indica que existe uma associação de HLA-DRB1 semelhante à AR ACPA<sup>+</sup> (73).

#### 2.1.5.1.2- Fator de risco genético não-HLA

Os diferentes tipos de linfócitos existentes são dotados de recetores na sua superfície e para que estes possam iniciar e estabelecer respostas imunológicas eficazes e duradouras, é preciso que haja ativação dos mesmos pelos seus recetores (114). Estes últimos, por sua vez, vão transmitir sinais intracelulares que, em última instância, irão culminar num processo de divisão dos linfócitos, seguido por uma fase de contração (115). Tal processo é designado por transdução de sinal (115).

A transdução de sinal é o resultado de uma assimilação sincronizada de sinais transmitidos por recetores (ativadores ou inibidores), presentes na membrana plasmática dos linfócitos e, de um ponto de vista geral, é regulada não só a nível molecular, como a nível celular (115). A nível celular destaca-se a atividade enzimática de cinases e fosfatases (por exemplo, Lck, PKC, CD45, SHIP), as sequências de aas (por exemplo, ITAM, ITIM, TBSM) e módulos proteicos ou domínios (por exemplo, SH, PH, PTB) presentes nos recetores, entre outros (116).

As cinases e fosfatases são enzimas, porém as primeiras transferem grupos fosfatos de um dador (por exemplo, ADP, ATP) para um aceitador (por exemplo, os aas serina, treonina ou tirosina, presentes numa proteína), enquanto que as segundas catalisam a remoção de grupos fosfatos (isto é, defosforilação) das proteínas (117).

Para que a transmissão de sinais extracelulares nos linfócitos suceda de maneira correta, é fundamental que ocorra regulação da fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina, serina e treonina (118). A ação concertada de cinases e fosfatases faz com que a transdução de sinais ocorra rapidamente e que qualquer irregularidade neste equilíbrio possa resultar em graves consequências, como o desenvolvimento de processos autoimunes, imunodeficiências e tumores malignos (118).

#### 2.1.5.1.2.1- Proteína Tirosina Fosfatase Não recetora do tipo 22

Como foi referido anteriormente e comprovado através de estudos, o *gene HLA-DRB1* é o gene mais fortemente associado à AR (119). Todavia, diversos estudos de associação baseados em polimorfismos de nucleótido único (SNP do inglês, Single Nucleotide Polymorphism) identificaram vários *loci* não-HLA em genes relevantes, como *PTPN22*, *TNFAIP3*, *TRAF1*, *PADI4* e *STAT4* (120)(119).

Ainda assim, um grande número de estudos caso-controle, demonstrou que o gene *PTPN22* é o fator de risco genético não-HLA mais importante para a AR, considerado um dos alelos mais comuns, relevantes para a autoimunidade (121)(119)(120)(122).

Foi no ano de 2004 que relataram a descoberta de que um SNP C1858T (rs24766601) no gene *PTPN22* está associado a DT1, AR e LES (122)(123). Primeiramente, foi identificado como um gene de suscetibilidade à DT1 em 2 populações independentes e, no mesmo ano, foi associado à AR na população caucasiana norte-americana, por Begovich e o seus colegas, os primeiros a relatar essa associação (122)(123)(124).

O *PTPN22* possui vários locais polimórficos, dos quais fazem parte os SNPs +1858C> T (rs24766601) e -1123G> C (rs2488457), encontrados em forte desequilíbrio de ligação (121). Porém, há evidências de que o SNP +1858C>T (que codifica para a substituição de aas R620W) está relacionado a um risco de várias DAs, das quais faz parte a AR, bem como a níveis de anti-CCP (121)(125).

O gene *PTPN22* humano encontra-se no locus 1p13.3-p13.1 e codifica uma proteína, a tirosina fosfatase linfoide (LYP do inglês, Lymphoid Tyrosine Phosphatase),

mais comumente referida por PTPN22, que compreende 807 resíduos de aas e contém um domínio catalítico e quatro locais de ligação a SH3 (125)(122)(121)(120). Os domínios SH consistem em sequências de aas presentes em proteínas sinalizadoras intracelulares, que detêm um nível elevado de homologia com regiões presentes nos membros da família de cinases Src (126).

A proteína LYP, expressa exclusivamente por células hematopoiéticas, atua como um “gatekeeper” da sinalização dos recetores das células T e B, TCR e BCR (do inglês, B-Cell Receptor), respetivamente (127)(128). Todavia, são também expressas por monócitos, neutrófilos, DCs e células “Natural Killer” (NK) (124). Esta proteína é dotada de um papel importante, dado que tem como função a regulação negativa da ativação e desenvolvimento das células T, isto é, previne a ativação espontânea das células T por defosforilação (a LYP é responsável por defosforilar as cinases Lck, Fyn e ZAP-70, as principais cinases sinalizadoras dos recetores das células T) e inativação de cinases associadas aos TCRs e dos seus substratos (124)(121)(127). A LYP inibe a atividade dos principais efetores de sinalização, atuando a jusante da ligação ao recetor, o que atenua a ativação das células T (129). Por outro lado, a esta proteína também lhe compete a regulação da homeostase imune através da promoção seletiva de respostas do IFN tipo I, após a ativação de recetores de reconhecimento de padrões de células mieloides (121).

As proteínas fosfatase de tirosina (PTP, do inglês Protein Tyrosine Phosphatase) são responsáveis pela regulação do estado de fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina, através da eliminação do grupo fosfato (130). Este processo é dinâmico e resulta da ação mútua de proteínas cinase de tirosina (PTK do inglês, Protein Tyrosine Kinase) e de PTPs (117). O mesmo integra um ponto de controlo crucial para que a transmissão de sinais extracelulares, consequente da agregação dos BCRs e TCRs, se dê de maneira correta (130).

A estrutura da LYP consiste em um terminal N, constituído por um domínio PTP clássico e específico de fosfotirosina, seguido por uma região ligante e por um longo terminal C, cuja estrutura ainda é desconhecida (122)(121)(120)(123). A ligação ao domínio SH3 da cinase de tirosina C-Src ou CSK (do inglês, C-terminal Src family Kinase) feita com grande afinidade pelo primeiro dos 4 “motifs” (P1-P4), que são ricos em prolina, presentes nos últimos 200 resíduos (122)(121)(120)(123).

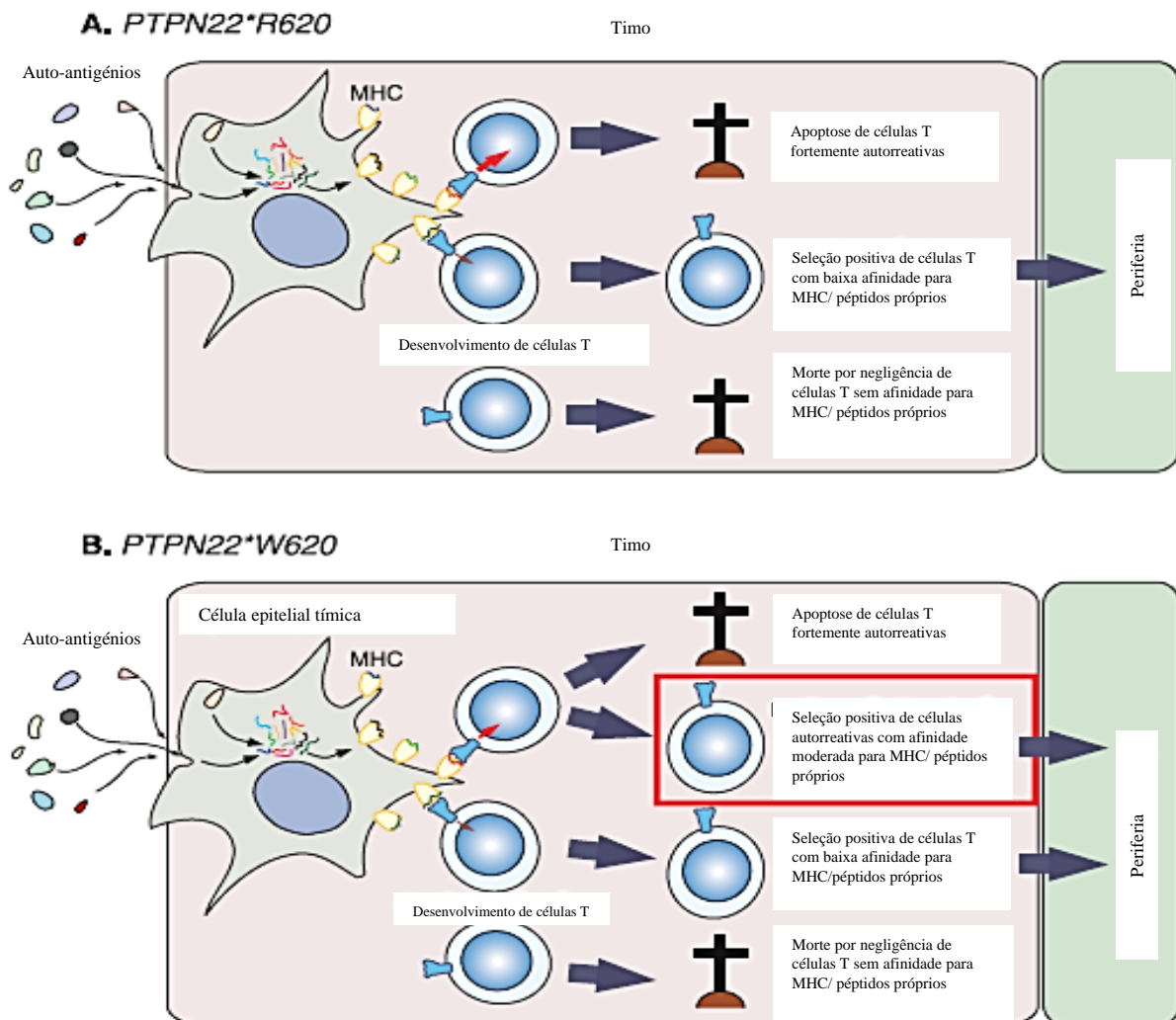
A LYP tem sido envolvida na defosforilação do resíduo de tirosina regulador positivo nas proteínas cinase de tirosina, da família Src alvo (122)(128), e de maneira complementar, a CSK fosforila o terminal C regulador negativo de Lck e outras cinases da família Scr, responsáveis por intervirem na sinalização de vários recetores imunes, tais como TCR e recetores de Ags de células B e recetores Fc (122). Isto confere-lhe uma função relevante como inibidora nas vias de sinalização do TCR assim como também do Fc, enquanto que o seu papel de sinalização para o BCR não é tão claro (122). Estudos demonstram que a LYP se encontra envolvida na modulação de populações de células B, bem como na verificação da tolerância através da sinalização BCR, porém ainda não foram estabelecidos os seus mecanismos exatos (128).

O alelo PTPN22 predisponente à autoimunidade consiste numa mutação de uma citosina (C) para uma timina (T) na posição 1858, o que altera o aa de Arg (R) para triptofano [Trp (W)] no codão 620, na proteína LYP (120)(123).

A mutação R620W, resultante do polimorfismo C1858T, presente no local de ligação à SH3, faz com que a ligação da LYP à CSK seja parcial ou completamente interrompida e está associada à AR, LES e DT1 (125)(120). Tal situação impede a formação de complexos e suprime a ativação de células T (120). Uma vez que a sinalização das células T se encontra reduzida, isso poderá fazer com que as células T autorreativas escapem da eliminação durante o processo de seleção tímica e, deste modo, permaneçam na circulação para serem ativadas posteriormente (120)(119).

Vang et al. relataram que LYP\*W620 é uma variante de ganho de função, isto é, cataliticamente mais ativa, e que a mesma predispõe a DA, uma vez que suprime a sinalização do TCR de forma mais potente durante o desenvolvimento tímico (123). Isto leva a que as células T autorreativas sobrevivam que, normalmente, seriam eliminadas por seleção negativa em indivíduos de genótipo LYP\*R620/ LYP\*R620 (Figura 2.5) (123).

Figura 2.5- Alteração da seleção tímica, que permite a sobrevivência de mais células T autorreativas e o seu escape para a circulação, em resultado da variante LYP associada à doença. Adaptado de (123).



O mecanismo pelo qual o alelo T aumenta o risco de doença mantém-se duvidoso, tendo sido expostos resultados controversos (127). Há autores, como referido anteriormente, que mostraram que esse alelo é uma variante de ganho de função (119). Por outro lado, foi também demonstrado que o mesmo é uma variante de perda de função, estando relacionado ao desenvolvimento de autoimunidade, uma vez que favorece um fenótipo hiperresponsivo em várias células do sistema imune, inclusive linfócitos T e B (127).

A associação do polimorfismo C1858T com a patologia AR foi vista em diferentes grupos étnicos, porém alguns estudos conceberam resultados discordantes (120). Esta situação poderá ter sido causada pelo facto de se usarem amostras pequenas,

pelas diferenças entre raças ou étnicas, assim como pela heterogeneidade clínica ou genética (120).

Um estudo levado a cabo por Nabi et. al, baseado numa abordagem de meta-análise, teve como objetivo investigar se o polimorfismo PTPN22 C1858T contribuía para a suscetibilidade à doença em populações asiáticas e caucasianas (120). O mesmo permitiu concluir que, em populações asiáticas, nos 3 modelos genéticos utilizados, o alelo PTPN22 1858T não está associado a um risco aumentado ou diminuído de AR, quando comparado com o alelo wild-type (120). Por outro lado, em populações caucasianas, foi detetada uma relação estatisticamente significativa entre o genótipo PTPN22 1858T e o risco de desenvolver a doença (120).

Assim sendo, os resultados obtidos no estudo anterior, relativamente às populações caucasianas, vão ao encontro com meta-análises realizadas anteriormente (120)(124). Porém, afirmaram que a presença isolada de uma variante genética geralmente é insuficiente para se prever o risco de desenvolver a patologia (120). A associação do polimorfismo com a patologia carece de consenso entre os estudos realizados em populações asiáticas (120)(119).

Um outro estudo relatou que existe uma grande variação entre as frequências do alelo T mutante nas populações caucasianas (120). Por outro lado, esse alelo não é observado nas populações coreana, japonesa, chinesa, tunisina, turca, indiana e russa (120). O que significa que a frequência desse alelo varia entre diferentes populações étnicas (120)(124). Isto permite deduzir que a relação entre o polimorfismo e a patologia depende da prevalência dos polimorfismos PTPN22 em diferentes grupos étnicos (120).

#### 2.1.5.2- Fatores não genéticos

##### 2.1.5.2.1- Tabagismo

O tabagismo, considerado como um dos fatores de risco ambientais modificáveis mais importante para a AR, não só pode diminuir o efeito do tratamento antirreumático, como pode exacerbar a progressão da doença (131)(132). Além do mais, em doentes

com AR, a atividade da doença é maior em fumadores, comparativamente a não fumadores, ou seja, também apresenta impacto na atividade da patologia (131)(132).

O risco de desenvolvimento de AR em fumadores é cerca de duas vezes nos homens e 1,4 vezes nas mulheres (133). Uma meta-análise de estudos observacionais, em 2010, divulgou que este fator pode aumentar em 40% o risco de desenvolver a patologia, em particular nos homens com AR FR-positivo (FR<sup>+</sup>) e fumadores frequentes (134).

O fumo do tabaco é composto por uma mistura de 4000 substâncias tóxicas, das quais fazem parte a nicotina, agentes cancerígenos, radicais livres, entre outros (134). Alguns destes compostos alteram a função fisiológica e, como tal, é preciso atentar que compostos distintos podem conduzir a efeitos diferentes, em diferentes mecanismos envolvidos no desenvolvimento e/ou progressão da doença (134).

Pensa-se que o facto de o tabagismo ser um fator de risco para o desenvolvimento desta patologia se deve à capacidade deste em “estimular” o sistema imunológico contra os Ags de proteínas citrulinadas, sobretudo quando os genes *HLA-SE* estão presentes, o que se pode traduzir em artrite (134)(135)(136).

Por outras palavras, o tabagismo pode interferir com os Ags peptídicos presentes nos pulmões, induzindo a sua citrulinação (137). A interação dos alelos SE com o tabagismo no aparecimento da imunidade anti-citrulina (isto é, imunidade aos péptidos citrulinados) pode culminar em AR ACPA<sup>+</sup> (137). Pacientes portadores do SE são aqueles em que a produção de ACPA é mais evidente (137)(138).

Evidências acumuladas respeitantes ao efeito de risco e efeito dose-resposta, especialmente entre indivíduos soropositivos, apontam para o tabagismo como o fator de risco ambiental mais relevante para a AR (135)(139)(140)(138).

Desde há muito tempo que vários estudos, tendo por base um modelo de interação aditiva, reconheceram a existência de interações reveladoras entre os alelos de SEs e o tabagismo para a suscetibilidade à AR soropositiva (140)(141)(142)(143). Segundo Klareskog et al., o SE e o tabagismo isoladamente não afetam a produção de autoanticorpos (144). Por sua vez, quando interagem entre si, tal confere risco de desenvolver AR e o mesmo só é verdade quando a AR é soropositiva, isto é, quando a AR é positiva para o FR e/ou anti-CCP (144).

O papel do tabagismo no desenvolvimento da AR não se confina ao que foi anteriormente referido (133). Existem outras hipóteses, como o aumento do número de células e citocinas, incluindo a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (133). No estudo de Sokolove et al. foi demonstrado que o estado de fumador ativo/atual está associado a um aumento de citocinas inflamatórias, muitas das quais estão associadas à patogênese da AR (inclusive, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-12p70 e IFN $\gamma$  (145). Por outro lado, também pode ter impacto nos resultados desta condição inflamatória, nomeadamente, as associações entre o tabagismo e os níveis de FR-IgA, responsáveis por resultados mais graves, o que foi comprovado em populações com a patologia, de diferentes etnias (134).

Por exemplo, em pacientes com AR de descendência europeia/caucasiana, o Ac FR-IgA demonstrou ser um preditor independente de dano articular grave na AR estabelecida (146). Além disso, tem sido associado quer à doença extra-articular (inclusive comprometimento pulmonar), quer ao mau estado funcional (146).

Estudos anteriores, na sua maioria, ao analisarem a relação dose-resposta entre o tabagismo e o risco de desenvolver AR sugeriram que, uma exposição cumulativa acima de 10 maços de tabaco por ano, era o limite a partir do qual se verificava o impacto do tabagismo, ao passo que houve outros estudos em que afirmaram que uma dose cumulativa abaixo de 10 maços de tabaco, mesmo entre fumadores leves, era considerada um risco aumentado (140)(147)(135).

Um estudo realizado por Hedström et al. demonstrou que existe um limite abaixo do qual não existe associação entre o tabagismo e a AR, quer para AR para ACPA<sup>+</sup>, quer para AR ACPA<sup>-</sup> (137). Independentemente da intensidade do tabagismo, para aqueles que fumavam há menos de 10 anos, não se verificou uma associação significativa (137). Este estudo foi ao encontro de estudos anteriores, no que respeita à duração e intensidade do tabagismo sobre o risco de desenvolver a doença (137). Os mesmos tinham afirmado que a duração tem mais impacto do que a intensidade, no desenvolvimento da doença (147)(148). São vários os estudos que apontam para a cessação tabágica como um possível passo para diminuir o risco de AR (135)(148)(137).

No estudo de Hedström et al. verificou-se que a cessação do tabaco reduz o risco de AR associada ao mesmo, porém, no que respeita a constância do efeito prejudicial no

risco de AR após interrupção, os resultados apresentados têm sido contraditórios (137)(147)(135). Relativamente ao risco de AR ACPA<sup>-</sup>, 20 anos após a cessação já não se verificava uma associação com o tabagismo, ao passo que para a AR ACPA<sup>+</sup> a associação com o tabagismo persistia, bem como dependia da dose cumulativa (137).

Num estudo prospetivo de uma coorte sueca de mamografia, o risco de AR era significativamente elevado após cessação do tabagismo para ex-fumadores, mesmo nos casos em que já tinham parado de fumar há mais de 15 anos, quando comparados a nunca fumadores (135). À medida que o tempo de cessação tabágica aumentava, o risco da doença foi diminuindo de forma constante, enquanto que o risco da doença não retornava ao risco inicial de AR de nunca fumadores (135).

O tabagismo está claramente associado ao desenvolvimento da AR, principalmente AR soropositiva, enquanto que para a AR soronegativa essa associação é atenuada ou nula (149)(150)(139). Todavia, os seus efeitos sobre a gravidade da patologia são muito contestados (149). Um estudo observacional numa coorte francesa prospetiva de artrite precoce, verificou que, em 1 ano, a progressão da doença em fumadores foi menor comparativamente a não fumadores (149). Esta situação pode ser esclarecida pela propriedade anti-inflamatória da nicotina no recetor colinérgico  $\alpha 7$  e sua ativação nos nociceptores espinhais (149).

Outros estudos relataram a existência de um efeito protetor do tabaco (151). Finckh et al. demonstraram que a progressão do dano radiográfico nas articulações ocorreu de forma equivalente em fumadores e não fumadores e, além disso, verificaram uma reposta contrária à dose, isto é, fumadores frequentes apresentaram uma menor progressão radiográfica, quando comparados com não fumadores e fumadores “leves” (151).

Diversos autores afirmaram que o tabagismo está relacionado com maior prevalência de erosões ou scores radiográficos maiores (ou seja, apresentam maior dano articular) (152). Todavia, ao contrário desses autores, outros há que não encontraram dados que provassem que o tabagismo afeta as articulações, assim como também não conseguiram encontrar um efeito protetor do fumo no número de articulações tumefactas, como foi o caso de Finckh et al. (152)(151).

#### 2.1.5.2.2- Microbioma

A AR compreende 2 estágios distintos, o estágio pré-clínico do qual fazem parte as fases de autoimunidade sistémica e de inflamação e o estágio clínico (153)(154). A fase de autoimunidade sistémica precede a fase inflamatória, portanto, durante a primeira, não existem sinais de artrite inflamatória, inclusive não há evidência histológica de sinovite (inflamação do revestimento sinovial das articulações) (153)(89)(91). Assim sendo, os autoanticorpos sistémicos estão presentes, isto é, há elevação sérica de autoanticorpos, mas não existe inflamação (153)(89). Tal situação corrobora o facto de que a autoimunidade tem origem num local que não nas articulações (153)(89). Além disso, tal é também comprovado pela alta prevalência de autoanticorpos do isotipo IgA que antecedem a AR, nomeadamente, ACPAs e o FR, uma vez que a IgA é o isotipo predominante de Ac dos locais da mucosa (153).

As superfícies da mucosa interagem intimamente com o ambiente externo e são, por isso, possíveis locais onde a autoimunidade pode ter origem, uma vez que podem produzir uma resposta autoimune anómala aos fatores ambientais (153)(89).

Doentes com AR estabelecida/diagnosticada e, particularmente, em indivíduos com autoimunidade sistémica associada à AR apresentam múltiplos locais da mucosa com desregulação imunológica e inflamação (153).

Não só as superfícies mucosas da cavidade oral, como também as do trato respiratório superior e do intestino, estão fortemente envolvidas na patogénese da AR e podem ser os locais de partida da autoimunidade (153)(155). Estas são colonizadas por microrganismos comensais, o qual se denomina microbioma e, quando este sofre alterações pode facilitar no desenvolvimento da imunidade inata e imunidade adaptativa, o que predispõe à AR (155).

A microbiota intestinal humana é composta por mais de 1000 espécies bacterianas, arqueias, fungos e vírus diferentes (156). Sabe-se que essas bactérias, para além de envolvidas na digestão e absorção de alimentos, também podem exercer uma função protetora, impedindo a adesão de bactérias patogénicas à mucosa, e desempenham um papel fundamental na modulação da imunidade inata e adquirida do hospedeiro (156). Por outras palavras, a microbiota comensal no intestino e em outras

cavidades da mucosa humana tem um papel fundamental quer no desenvolvimento, quer na regulação do sistema imunológico (89).

Quando há modificações na estrutura das comunidades intestinais comensais, isto é, disbiose, há uma maior exposição a uma variedade de bactérias e produtos bacterianos, o que conduz a um estímulo crónico dos Ags, disseminação de mediadores inflamatórios e ativação de células T (156).

Recentemente foi demonstrado o envolvimento de distintos fatores ambientais, como dieta, tabagismo, infeções e medicamentos no desenvolvimento da disbiose intestinal/oral e no início e desenvolvimento da AR (156). Até agora não se sabe se diferentes locais da mucosa em diferentes indivíduos ou múltiplos locais da mucosa num mesmo indivíduo estão envolvidos no desenvolvimento da AR (153). Trabalhos atuais referem que o microbioma humano está profundamente relacionado não só com a AR, como com outras DAs, como o LES, Doença Inflamatória Intestinal e DMT1 (89). Para além disso, sugere-se que o microbioma possa influenciar a expressão génica por modificações epigenéticas e, como tal, pode desempenhar um papel crucial na indução e no desenvolvimento de DAs (89).

Em suma, é possível concluir que há uma relação entre o microbioma humano e o sistema imunológico (89). É cada vez mais evidente que alterações na composição e função do microbioma são capazes de regular o desenvolvimento e a função do sistema imunológico através de modificações epigenéticas, o que pode culminar na quebra da homeostase imune e, posteriormente, no desenvolvimento de DAs (89).

#### 2.1.5.2.3- Infeções

Em indivíduos predispostos, as infeções são consideradas como potenciais iniciadoras de DAs, isto porque ao induzirem uma resposta inflamatória intensa de forma frequente, podem ajudar na ativação policlonal de linfócitos que migram para o local e/ou para a libertação de Ags sequestrados (157). De entre os fatores ambientais envolvidos na patogénese das DAs, estão presentes as infeções e exposição a agentes patogénicos ou organismos oportunistas que, por sua vez, podem incitar ou exacerbar as

DAs (17). Vários tipos de infecção podem afetar uma ou mais destas doenças e várias DAs podem ser provocadas por um único organismo (17).

Considera-se que as infecções podem estar associadas à autoimunidade, de duas formas (158). Por um lado, foi provado que, para a maioria das DAs, os agentes infecciosos são possíveis desencadeadores de autoimunidade (158). Por outro lado, segundo a “hipótese da higiene”, em diferentes condições, algumas infecções podem conferir proteção contra a autoimunidade (158).

A maioria dos vírus infetam o hospedeiro através do trato GI e genitourinário, das mucosas, ou da pele, replicando-se dentro das células (159). Para tal, usam moléculas de superfície das células como recetores para a sua entrada, como por exemplo, o vírus Epstein-Barr (EBV, do inglês Epstein-Barr virus) liga-se aos recetores do tipo 2 do complemento (CD21) nas células B (159). A relação entre agente infeccioso e o desenvolvimento da AR tem sido debatida há muitos anos (160). Há algumas décadas foi relatado, por investigadores, que doentes com AR têm maior frequência e títulos de Acs aumentados contra o EBV em comparação com os controles (160). Acredita-se que este vírus infete cerca de 95% da população mundial, antes dos 40 anos, sendo um dos vírus mais comuns no ser humano (161).

A partir daí, vários estudos abordaram o possível papel das infecções virais na etiopatogenia desta patologia e não só o EBV foi implicado, como também o parvovírus humano B19 (B19) e o citomegalovírus (CMV) (160).

Vários estudos sorológicos demonstraram a presença de níveis mais elevados de Acs contra estes vírus e/ou um aumento da frequência de Acs na AR, quando comparados com os controles, porém houve estudos que não obtiveram os mesmos resultados (160). Além de evidências sorológicas, foi detetada a presença de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês deoxyribonucleic acid) viral na sinóvia e medula óssea de indivíduos com a doença, como também houve estudos que detetaram a presença de proteínas virais nas articulações nesses pacientes (160). Mas, mais uma vez, houve estudos com resultados contraditórios (160).

No estudo realizado por Sherina et al., cujo objetivo era investigar uma possível associação entre a infecção por vírus comuns (EBV, B19, CMV) e o desenvolvimento da AR, não foi possível detetar, para nenhum deles, uma relação entre a patologia e níveis elevados de Acs antivirais (160). Por outro lado, foi demonstrada uma associação entre

baixos níveis de Acs anti-EBV/anti-B19 e a AR ACPA<sup>+</sup>, principalmente quando o HLA-DRB1 SE estava presente, o que poderia indicar que altos níveis de Acs antivirais seriam protetores, porém, são necessárias investigações adicionais (160).

Pelo contrário, houve estudos que indicaram que o EBV pode estar relacionado com a disfunção autoimune nos doentes com AR, isto porque foi demonstrada uma resposta imune humoral e celular anti-EBV elevada nestes pacientes (161). Em pacientes com AR, verificou-se a presença de níveis elevados de Acs contra proteínas do EBV, comparativamente a controles saudáveis e de doenças (161).

Relativamente às infecções por bactérias intracelulares, como o nome indica, vivem dentro das células e, por isso, estão protegidas dos mecanismos de defesa humoral (162). Na maior parte das vezes, entram no hospedeiro aderindo ao epitélio das mucosas e, para tal, podem fazê-lo pelo pulmão (como a *Mycobacterium tuberculosis* ou a *Legionella pneumophila*) ou pelo intestino (como a *Salmonella* entérica ou *Listeria monocytogenes*) (162).

Foi no ano de 1968 que Hill sugeriu que a infecção bacteriana poderia estar associada à AR, dado que algumas infecções podem estimular a destruição do tecido (163). Por outro lado, em 1985, Ebringer et al. reconheceram *Proteus mirabilis* como um agente potencialmente envolvido na patogénese da AR, isto porque foram encontrados em pacientes com AR, Acs séricos anti-*Proteus mirabilis* elevados e foi sugerido que estes podiam contribuir para danos e inflamação nas articulações (163)(164). Em doentes com AR, verificou-se a existência de uma correlação positiva entre níveis elevados de Acs séricos contra *Proteus mirabilis* e o número de unidades formadoras de colónias de *Proteus* (164). Além disso, comparando com controles saudáveis, verificou-se que indivíduos com AR apresentavam, mais frequentemente, bacteriúria assintomática (164).

Pensa-se que esta bactéria colabora no desenvolvimento da doença, em indivíduos suscetíveis, através de mimetismo molecular (164). Assim sendo, Acs contra epítomos antigénicos de *Proteus mirabilis* formam uma ligação com autoantigénios reativos cruzados que apresentam uma sequência de aas semelhante (164).

O estudo realizado por Newkirk et al. relatou que padrões distintos de colonização bacteriana e perfis de Acs bacterianos podem existir em pacientes com AR inflamatória, no início da patologia, em pacientes FR<sup>+</sup> e FR-negativo (FR<sup>-</sup>) (163).

Verificaram ainda que os FRs se correlacionam com a resposta antibacteriana (163). A resposta do FR-IgM foi associada à resposta do Ac IgM anti- *Escherichia coli* e a resposta do FR-IgA com as respostas anti-*Preoteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* (163).

### 2.1.5.3- Epigenética

Em 1940, a epigenética foi definida por Conrad Waddington como “*o ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos que dão origem ao fenótipo*” (17). Atualmente, entende-se como epigenética, o estudo dos mecanismos moleculares que alteram a cromatina (comumente, de forma estável e hereditária) que, sem modificar a sequência de DNA, podem conduzir a alterações na expressão génica (165)(19)(166).

As alterações epigenéticas estão associadas a várias patologias humanas e encontram-se controladas pela interação entre fatores ambientais e o contexto de cromatina, originando diversos fenótipos (167). Para que haja uma regulação e manutenção das funções biológicas de cada tipo de célula, é importante que a homeostase epigenética se mantenha, caso contrário pode resultar em doenças, nomeadamente, doenças cancerígenas (168)(167). Alterações no epigenoma foram relacionadas à AR (168).

Os mecanismos epigenéticos, dos quais fazem parte a metilação do DNA, modificação de histonas e expressão de microRNAs (miRNAs) vão interferir com a expressão dos genes ou com a eficiência da tradução (169)(165)(170). Tal acontece sem modificar a própria sequência de DNA, o que leva a que se suponha que essas alterações, que normalmente atuam em conjunto, possam ser os intermediários através dos quais o ambiente pode ter impacto na doença, abrangendo as DRs autoimunes (169).

Os fibroblastos sinoviais da artrite reumatoide (RASFs, do inglês Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts), também conhecidos como sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLSs do inglês, Fibroblasts-Like Synoviocytes) ou fibroblastos sinoviais (SFs do inglês, Synovial Fibroblasts) são dotados de características que estão

comumente associadas a um fenótipo agressivo, como é o caso da regulação positiva de proto-oncogenes, enzimas específicas que degradam a matriz, moléculas de adesão e citocinas (166). Além disso, não só danificam as articulações como também são resistentes à apoptose, o que pode culminar em hiperplasia sinovial (166).

Embora já se tenham feito grandes esforços de investigação, ainda não é conhecida a causa da AR, assim como não se conhece o mecanismo autor do fenótipo reumatoide agressivo (166)(171). Durante a pré-AR, que dura vários anos, os ACPAs podem ser detetados, mesmo antes de se verificarem manifestações clínicas, o que remete para uma desregulação imune precoce (172)(173). Todavia, ainda não se compreende as ligações entre os eventos genómicos e ambientais, mas sabe-se que os mecanismos epigenéticos podem mediar os efeitos ambientais (173).

Vários fatores de risco ambiental, por intermédio de mecanismos epigenéticos, podem ter efeito na patogénese de DAs, o que permite fazer uma ligação entre os fatores de risco ambientais e genéticos (19). De uma forma direta ou indireta, muitos dos fatores ambientais que estão associados ao desenvolvimento da AR induzem modificações epigenéticas que vão modular a expressão génica e, deste modo, estão relacionadas com as alterações na função celular (114). Assim sendo, podemos obter a explicação do facto dos efeitos ambientais estarem envolvidos no desenvolvimento de distúrbios autoimunes (114).

No presente, existem estudos com gémeos que apoiam largamente a ideia de que, quer os antecedentes genéticos, quer as alterações epigenéticas cooperam para o desenvolvimento de DRs (174). Através da realização de GWASs, identificaram-se perto de 60 alelos de risco para a AR, e crê-se que somente 16% da suscetibilidade total seja representada por fatores de risco genéticos (175)(176).

Todavia, em estudos realizados com gémeos, a estimativa da herdabilidade variou entre 12 e 68% (176)(177)(178)(179). Além do mais, para inferir herdabilidade genética somente comparações entre gémeos DZ e MZ monocoriónicos se mostraram válidas, isto porque gémeos MZ dicoriónicos, não só são idênticos devido à sequência de DNA, como também apresentam uma maior correlação intraclasse da metilação do DNA (DNA mensageiro, DNAm) do que gémeos MZ monocorionicos e DZ (175).

Assim sendo, o facto de os gémeos MZ apresentarem maior concordância pode não ser apenas pela sequência de DNA apresentar um maior grau de semelhança, isto

porque, os mecanismos moleculares de herdabilidade podem não se restringir à mesma (175). Por outro lado, as várias manifestações clínicas da AR nos gémeos MZ concordantes para a AR assinalam o valor dos fatores não genéticos na expressão da doença (175). Portanto, cada vez mais surgem evidências sobre o papel relevante dos fatores ambientais ou estocásticos, na etiologia e expressão desta patologia, além de que o seu efeito pode ser mediado por mecanismos epigenéticos (175).

A compreensão sobre a suscetibilidade e a gravidade da AR foi rapidamente adquirida através da Genómica, tendo sido descrito vários polimorfismos associados aos principais genes (171). Todavia, a taxa de concordância para AR é inferior a 20% para gémeos MZ e, deste modo, é 4 vezes superior à de gémeos DZ, porém é notavelmente inferior a 100% (174)(180)(181). Deste modo considera-se que os fatores ambientais estão fortemente implicados na etiologia da doença, e que a influência epigenética pode afetar o início ou a progressão da AR (180)(181) (171).

Em suma, o facto de gémeos idênticos apresentarem uma taxa de concordância baixa, leva a crer que a genética não é suficiente para explicar o risco de desenvolver a doença (182). Por sua vez, fatores ambientais e modificações epigenéticas podem elucidar a parte não genética da suscetibilidade à doença (182). Além disso, atualmente é de grande interesse mostrar que as alterações epigenéticas podem ser potenciais biomarcadores para fazer a distinção entre controles saudáveis e pacientes, bem como fazer uma separação entre pacientes com prognóstico ou em resposta ao tratamento (183).

Os mecanismos epigenéticos são vistos como um possível alvo terapêutico desta patologia, uma vez que influenciam potencialmente a patogénese da mesma (184)(185).

#### 2.1.5.3.1- Metilação do DNA

A metilação do DNA é considerada o fenómeno epigenético mais largamente estudado, podendo servir como uma medida constituída por diversas exposições ambientais, o que faz com que este fenómeno seja considerado um candidato ao estudo de patologias das quais façam parte fatores genéticos e ambientais, como é o caso da AR (186)(168).

Vários estudos propõem que as modificações na metilação do DNA estão relacionadas à AR, porém não se conhece se o mesmo se deve a diferenças genéticas intrínsecas (187)(182)(188)(189)(169)(114). Este mecanismo consiste na adição, à sequência de DNA, de um grupo metilo (CH<sub>3</sub>) aos locais de dinucleótido citosina-fosfato-guanina (CpG, do inglês cytosine-phosphate-guanine dinucleotide), ou seja, na citosina seguida pela guanina, por transferência enzimática do grupo metilo da S-Adenosil-L-Metionina (SAM) (183)(166). Nesses locais de CpG, a citosina é convertida em 5-metilcitosina por ação das DNA-metiltransferases [DNMTs, (nos mamíferos as DNMT1, DNMT3a e DNMT3b são as principais responsáveis)] (166)(171). A ocorrência deste mecanismo nos locais CpG, na região do promotor ou perto, vai suprimir a transcrição de genes, nomeadamente quando os CpGs estão agrupados em regiões denominadas de ilhas CpG (CGIs) (166)(168).

A AR é caracterizada por hiperplasia sinovial, inflamação crónica, bem como destruição progressiva das articulações sinoviais (170). Um dos principais fatores do dano articular são os FLSs, que fazem parte da sinóvia que envolve a articulação (170). Contrariamente aos FLSs da sinóvia normal, na AR, estes comportam-se como que tivessem sido transformados, apresentando um fenótipo ativado, agressivo e invasivo (170). Estas células apresentam um comportamento anormal, e o facto de a desregulação da transcrição das mesmas ocorrer na ausência de mutações genéticas, leva a crer que existe intervenção de mecanismos epigenéticos (190).

Desde há muito tempo foi reconhecido que existem alterações na metilação do DNA nos SFs em pacientes com AR (191)(192). Além do mais, a análise de vias dos *loci* diferencialmente metilados (DML, do inglês *Differentially Methylated Loci*) demonstrou que essas alterações têm impacto nos genes precocemente envolvidos na patogénese da AR (193). Deste modo, pensa-se que o fenótipo ativado e destrutivo dos RASFs seja mediado por alterações na metilação do DNA (194).

O estudo realizado por Karouzakis et al. demonstrou que a metilação do DNA nos RASFs é modificada nos estágios iniciais da AR não tratada (194). O fenótipo ativado característico dos RASFs foi sugerido como sendo uma propriedade intrínseca dessas células, uma vez que, quando implantados juntamente com cartilagem humana, em ratos, provocaram invasão da mesma, sem ser necessário apoio de outras células (191). Estas células diferem de SFs de pacientes com osteoartrite (OASFs, do inglês *osteoarthritis synovial fibroblasts*) ou dos SFs normais, apresentando atividades

“espontâneas” relacionadas ao comportamento agressivo (191). Como exemplo, regulam positivamente os proto-oncogenes, enzimas específicas de degradação da matriz, moléculas de adesão e citocinas (191). Deste modo, foi realizado um estudo que procurou descobrir se a ativação intrínseca dos RASFs é causada por uma modificação epigenética, mais precisamente, por hipometilação genómica global (191). A partir deste estudo foi possível demonstrar que a desmetilação do DNA de SFs normais incita um fenótipo idêntico ao de RASFs ativados, o que significa que a hipometilação é uma característica destas células e está relacionada com a patogénese da AR (191).

Crê-se que exista uma relação entre a hipometilação global e a hipermetilação típica do promotor com patologias, inclusive DAs (190). Vários estudos, em todo o genoma, demonstraram hipometilação e hipermetilação de vários genes de FLSs originários de tecidos, em doentes com AR (190)(171)(114). A sobre-expressão de genes considerados fundamentais para o processo da doença está relacionada com a hipometilação de locais característicos do CpG nos FLSs (183). Além disso, foi sugerido por estudos *in vitro* que a hipometilação é a principal responsável pelo fenótipo agressivo dos RASFs (191).

É comumente observado que a hipometilação do DNA é como que um resultado da carência de DNMTs na proliferação de RASFs (195). Isto conduz a um aumento da tradução de enzimas degradantes da matriz, moléculas de adesão e recetores envolvidos na patogénese da AR (195). Hipometilação, instabilidade genómica e tumorigénese foram associadas à diminuição dos níveis de DNMT1 (191). Por outro lado, também se observa hipometilação global nas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês Peripheral Blood Mononuclear Cells), quando se compara com controlos saudáveis (196). E crê-se que isso contribua para a inflamação do tecido sinovial, uma vez que facilita a produção de citocinas pró-inflamatórias pela cromatina (196).

Com o objetivo de descobrir a causa da hipometilação em RASFs, foi realizado um estudo por Karouzakis et al. (197). Estes investigadores propuseram que a utilização em demasia da enzima SAM, em particular pelo metabolismo das poliaminas, poderia contribuir para tal e, de facto, essa hipótese foi confirmada (197).

Recentemente, foi demonstrado que a patogénese da AR encontra-se associada a alterações do metiloma do DNA, de forma idêntica à carcinogénese (198). Para ambas

as patologias, foi descrita a presença de processos característicos de hipometilação que atingem as regiões intergênicas e intragênicas, assim como hipermetilação de promotores de novo (198).

Na AR, o significado de hipermetilação do DNA é pouco entendido, tendo sido demonstrado apenas de forma indireta (198). Foi então proposto que a hipermetilação específica do *locus* nas células B pode ser relevante para a patogênese e, deste modo, inibidores da metilação do DNA [como a 5'-azacitidina (5'-azaC)] poderão ter um papel terapêutico na AR (198).

A hipermetilação do DNA também é responsável pelo fenótipo ativado dos RASFs (199). Um estudo demonstrou que, no promotor do gene do recetor da morte 3, pertencente à família do gene *Fas* indutor da apoptose, a hipermetilação do DNA está associada a esse fenótipo (199). Resumindo, a metilação do DNA pode assumir uma posição importantíssima ao nível do dano articular em consequência da impressão epigenética dos FLSs na AR (193).

#### 2.1.5.3.2- MicroRNAs

Os miRNAs correspondem a ácidos ribonucleicos (RNA, do inglês ribonucleic acid) endógenos, pequenos (18 a 25 nucleótidos) e não codificantes, que controlam a expressão génica por hibridação, com sequências complementares, nas regiões 3'-não traduzidas (3'-UTR, do inglês 3'-untranslated regions) do RNA mensageiro (RNAm), o que leva à clivagem, repressão translacional ou desestabilização do RNAm (200)(201)(202)(203). Foi relatado que estes intervêm em processos celulares importantes, bem como que a sua desregulação está presente em vários tipos de células, em diferentes patologias (200). Estes são associados a um vasto conjunto de funções celulares, inclusive proliferação celular, diferenciação, apoptose, ciclo celular, migração e invasão e, por sua vez, estão relacionados à patogênese de diversas DAs (204)(203). Vários estudos demonstraram que os miRNAs estão envolvidos não só na progressão, como também no desenvolvimento da AR (203)(205).

Os miRNAs aparentam estar envolvidos no monitoramento da progressão da AR através da regulação da proliferação, apoptose, migração e invasão dos RASFs (203).

Assim sendo, uma compreensão mais aprimorada dos mecanismos dos miRNAs associados à doença pode ajudar tanto no diagnóstico como no tratamento da mesma (203).

Os RASFs apresentam semelhanças a tumores, responsáveis pela formação do pannus e dano nas articulações, das quais fazem parte a taxa de proliferação aumentada, capacidade anti-apoptótica, assim como características pró-migratórias e pró-invasivas (206)(204). De outra forma, estes estão associados à persistência da inflamação crônica pela produção de citocinas pró-inflamatórias (inclusive, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) (204).

Por outro lado, existem estudos que demonstram que os RASFs apresentam uma expressão desregulada do miRNA que, por sua vez, pode ser a autora de vários processos que envolvem a AR (207)(208)(209)(201). O fenótipo agressivo dos RASFs pode, também, resultar da expressão anômala do miRNA (193). Sabe-se que a ocorrência da apoptose dos FLSs de forma não adequada desempenha um papel importante na imunopatogênese desta doença (206). Deste modo, a sua indução seria necessária para controlar a doença (203).

O estudo realizado por Liu et al. verificou que a expressão do miRNA-29a encontra-se reduzida no soro, tecido sinovial e nos FLSs de pacientes com AR (203). Porém, quando sobre-expresso, impede a proliferação e propicia a apoptose celular através do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT, do inglês Signal Transducer and Activator of Transcription)3, portanto o miRNA-29a pode ser um alvo crucial para controlar a AR (203).

Alterações nos níveis de expressão do miRNA vão ter repercussão na expressão dos genes alvo, de 1,2 a 4 vezes e, deste modo, são vistos como um mecanismo que regula a expressão de proteínas (201). Assim sendo, crê-se que a regulação das respostas imunes inatas e adaptativas seja uma função dos miRNAs (201).

Também foi demonstrada desregulação da expressão de miRNAs, tais como, miR-132, miR-146a e miR-155 (202). Numerosos estudos verificaram que estes estavam aumentados nas células sanguíneas comparativamente aos controles saudáveis, e sabe-se que os mesmos têm um papel relevante na modulação da doença na AR (202).

Os potenciais estímulos desta patologia envolvem citocinas, uma vez que, quando existe desregulação da rede de citocinas pode ocorrer inflamação descontrolada,

culminando na doença (210). Fazem parte dessas citocinas inflamatórias, o TNF- $\alpha$  e a IL-6, que estão implicadas na patogênese desta doença (210). E sabe-se que a secreção da primeira por macrófagos sinoviais pode ser um fator importante na sinovite (210).

Dada a sua redundância, especula-se que os miRNAs possam regular a rede de citocinas durante a patogênese da doença (210). Existem dados que apontam para o processo inflamatório como o resultado da contribuição da expressão alterada dos miRNAs, ao afetar as células sinoviais que residem na articulação e a sua rede de citocinas (210).

O estudo realizado por Migita et al. demonstrou que o miR-155, induzido pela estimulação do TNF- $\alpha$ , inibe a ativação de Janus Kinase(JAK)2/STAT3 mediada pela IL-6 nos RASFs, o que significa que este miRNA ajuda na regulação cruzada entre as vias inflamatórias mediadas por estas citocinas (210).

A erosão óssea articular, característica da AR, resulta da interação entre a inflamação e as vias que regulam o metabolismo ósseo (211). Por outro lado, também se conhece que a inflamação propicia a osteoclastogênese e inibe o papel dos osteoblastos, o que faz com que as erosões perdurem ainda mais (211).

É conhecido, também, que os miRNAs exibem um papel crucial, regulando a homeostase óssea, por um mecanismo de silenciamento de genes, e que estes são os principais moduladores da inflamação pós transcricional (211). Além disso, sabe-se que o aparecimento da AR está estreitamente relacionado com a hipometilação das células T CD4<sup>+</sup> (212). O estudo realizado por Yang et al. foi o pioneiro na descoberta da função do miR-126 (212). Este encontra-se associado à redução do nível de metilação do DNA em genes relacionados às células TCD4<sup>+</sup>, por ativação da expressão génica, culminando na patogênese da AR (212).

Concluindo, nos últimos tempos ficou claro que pacientes com AR apresentam modificações de expressão de miRNAs (200). Numerosos estudos têm vindo a demonstrar que a desregulação dos miRNAs nas PBMCs, em linfócitos T isolados, assim como no tecido sinovial e nos SFs, assume um papel crucial na inflamação, degradação da matriz extracelular (MEC), bem como no comportamento invasivo das células residentes (200).

Portanto, os miRNAs apresentam um amplo interesse como biomarcadores, uma vez que o seu padrão de expressão anormal representa os processos fisiopatológicos que estão implícitos (213). Além disso, sabe-se que os miRNAs são dotados de papéis relevantes nos processos inflamatórios e que terapias gênicas baseadas nestes, mais precisamente, tendo os miRNAs desregulados como alvos, exibem um potencial notável (210).

Diversos estudos sugerem que os miRNAs são uma potencial estratégia terapêutica (214). Por exemplo, a sobre-expressão do miR-218 pode, por um lado, auxiliar na reparação do dano ósseo e, por outro, suprimir a erosão óssea (214). Deste modo, providenciar miR-218 aos RASFs ou aumentar o seu reservatório poderia ser uma ótima estratégia (214).

#### 2.1.5.3.3- Modificação de histonas

Atualmente, surge cada vez mais evidências de modificações epigenéticas na AR, estando o foco voltado para a metilação do DNA e para os miRNAs (184). Todavia suspeita-se que exista um outro mecanismo epigenético relacionado com a patogênese da AR, a modificação de histonas, embora ainda se saiba pouco sobre o assunto (184).

Modificações pós-traducionais covalentes, como é o caso da metilação, acetilação e ubiquitinação de lisina, metilação de Arg, e fosforilação de serina e treonina, são mecanismos aos quais as caudas aminoterminais da histona são submetidas (184)(199). Acredita-se que a regulação da transcrição de genes se deve a uma combinação intrincada das mesmas (199).

As histonas acetiltransferases (HATs, do inglês histone acetyltransferases) e desacetilases (HDACs, do inglês histone deacetylases) assumem um papel de controlo da acetilação e desacetilação das histonas, respetivamente (215). De facto, pensa-se que a acetilação de histonas está associada ao aumento da taxa de transcrição génica e, por sua vez, que a desacetilação se encontra relacionada com a repressão devido à condensação da cromatina (216)(217). Acredita-se que a quebra do equilíbrio fisiológico entre estas enzimas e proteínas possa conduzir à desregulação da transcrição

de genes pró-inflamatórios (*TNF* e *IL-8*), traduzindo-se em condições patológicas (215)(217).

Através da investigação inicial do tecido sinovial da AR verificou-se que, quer a atividade quer a expressão da HDAC estavam diminuídas de forma idêntica (218). Tal sugere que, uma modificação na atividade HDAC/HAT que impele a acetilação possa integrar uma característica de patologias inflamatórias crônicas (218). Todavia, quando comparada com a osteoartrite (OA), a AR apresentava a HDAC1 elevada e esta está relacionada positivamente com a expressão do TNF (218). Por outro lado, o uso de inibidores de HDACs (HDACi, do inglês HDAC inhibitor ) conduz à redução da síntese de citocinas inflamatórias por células imunes e do estroma, provenientes de pacientes com AR (218).

O campo da epigenética tem destacado a metilação das histonas, e sabe-se que alterações na metilação de H3K27 e H3K4, na região promotora, funcionam como marcadores da atividade génica (219). Existem evidências de que a trimetilação da lisina 27 na Histona H3 (H3K27me3, do inglês Histone H3 lysine 27 trimethylation) e a monoubiquitinação da lisina 19 na histona H2A (H2AK19Ub1, do inglês Histone H2A lys119 mono-ubiquitination) se relacionam à repressão da transcrição génica, ao passo que a trimetilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3, do inglês Histone H3 lysine 4 trimethylation) associa-se à ativação da transcrição génica (220).

Cada vez mais vão surgindo provas de que modificações ou disfunções, dinâmicas ou provocadas, dessas alterações nas histonas, exercem um controlo na diferenciação e maturação da função de células imunes (220).

A metilação de histonas é considerada um processo reversível, levado a cabo pelas histonas metiltransferase e desmetilase (219). Ao remover o grupo metilo H3K27me2/3, a histona desmetilase UTX pode promover a transcrição (219). Foi então proposto que, níveis aumentados de H3K27me2/3 no decorrer da doença, possam dever-se à expressão anómala da UTX (219). Verificou-se ainda que, nas fases progressiva e no pico de inflamação, a expressão da UTX reduziu drasticamente, o que demonstra que alterações na H3K27me3, na região promotora, correlacionam-se com a expressão reduzida da UTX (219).

As articulações inflamadas presentes na AR caracterizam-se por destruição da cartilagem, sendo esta última levada a cabo por MMPs e catepsinas, que fazem parte das

enzimas produzidas pelos RASFs (199). Observou-se que a metilação da histona está relacionada com o aumento da expressão das MMPs (MMP-1, 3, 9 e 13) (199). Portanto, a modificação na estrutura da cromatina nos genes da MMP resulta da alteração dos padrões de metilação da histona, como H3K4me3 e H3K27me3 (199).

Um estudo concluiu que as enzimas desmetilases, nomeadamente a UTX, propiciam o desenvolvimento das células NKT, uma vez que o aumento da metilação da H3K27 impede o desenvolvimento de células NKT em ratos (221). Por outro lado, também se verificou que as mesmas são cruciais para que estas possam funcionar eficazmente (221).

As células NKT conseguem secretar uma grande variedade de citocinas e, uma vez que são dotadas de uma ação rápida, assim como conseguem alcançar a corrente sanguínea rapidamente, assumem um papel relevante na inflamação patogénica, no fígado e nos pulmões, para além do seu efeito no combate do cancro e da infeção, no decurso de repostas imunes inatas (221).

O estudo realizado por Zhang et al. concluiu que a sobre-expressão da MLL1 (uma histona metiltransferase que se demonstrou desregulada nos RASFs) contribui para a migração e invasão de RASFs, por ativação da via de sinalização interferon- $\beta$  indutor do adaptador que contém o domínio TIR (TRIF, do inglês TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )/ fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, do inglês Nuclear Factor-kappaB), que, por sua vez, resulta da regulação positiva do recetor toll-like (TLR, do inglês Toll-Like Receptor) 4, exacerbando o desenvolvimento desta patologia (222).

A MLL1 é responsável pela tri-metilação da H3K4me3 na região promotora do TLR4 (222). Este último é dotado de grande importância, uma vez que está envolvido na ativação de RASFs, o que se traduz em inflamação crónica e destruição articular (222). Assim sendo, este mecanismo epigenético poderá ser vantajoso na identificação de prováveis alvos terapêuticos da AR (219)(199)(222). Por exemplo, o silenciamento da MML1 vai impedir a ativação da via de sinalização, o que leva à redução de TLR4 (222). Isto culmina na inibição da migração e invasão dos RASFs, fornecendo uma base teórica para o tratamento da AR (222). Por outro lado, o desenvolvimento das células NKT permite explorar o controle epigenético dos *outcomes* da linhagem (221).

## 2.1.6- Terapêutica

### 2.1.6.1- Terapêutica farmacológica

O tratamento da AR progrediu bastante, nos últimos anos (223)(224). O aparecimento da terapêutica combinada com DMARDs, a percepção acerca do tratamento precoce e do seu controlo rigoroso, assim como a introdução dos agentes biológicos, colaboraram para uma melhoria dos resultados (224).

Tal como referido anteriormente, a AR é uma doença crónica que se caracteriza por inflamação e destruição progressiva das articulações sinoviais (223)(225). A longo prazo, esta pode conduzir a incapacidade e redução da qualidade de vida, assim como redução da expectativa de vida em, aproximadamente, 10 anos (223)(225). É recomendado que o tratamento dos doentes com AR seja o mais precoce possível, de modo a induzir a baixa atividade da doença (LDA, do inglês Low Disease Activity) ou a atingir a remissão clínica e, posteriormente, o uso de um tratamento menos intensivo, com o objetivo de sustentar essa resposta (226)(227).

Segundo o ACR e a EULAR, o termo remissão é definido como, pontuação do Índice Simplificado da Atividade de Doença (SDAI, do inglês Simplified Disease Activity Index)  $\leq 3,3$  ou remissão booleana (contagem de articulações sensíveis [TJC, do inglês tender joint count]  $\leq 1$ , contagem de articulações tumefactas [SJC, do inglês swollen joint count]  $\leq 1$ ; PCR  $\leq 1$  mg/dL e avaliação global do paciente [PGA, do inglês Patient Global Assessment ]  $\leq 1$  na escala de 0 a 10) (227).

A evolução desta doença caracteriza-se pela presença de crises inflamatórias relacionadas com a inflamação da membrana sinovial articular, dano gradual dos ossos e cartilagens, associada a fortes dores (225). Diversos estudos referiram que o tratamento intensivo da AR melhora a progressão radiográfica da doença, a função física e a qualidade de vida (228). E, uma vez que houve progresso nas terapias disponíveis, a principal meta é atingir a remissão (228).

Atualmente, recorre-se a 5 linhas terapêuticas, cujo objetivo é controlar a progressão e os sintomas da doença: sDMARDs; bDMARDs; GCs; AINEs e analgésicos (painkillers) (12)(229)(230).

A administração de GCs está incluída na estratégia terapêutica da AR, com o objetivo de atenuar a inflamação articular no decorrer das crises, porém é limitada a um curto período de tempo devido aos seus efeitos colaterais graves (225). Na prática clínica são amplamente prescritos devido às suas fortes propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (231).

Para o alívio da dor recorre-se aos AINEs, o que pode traduzir-se numa melhoria da qualidade de vida, podendo ser relevantes, nomeadamente para aqueles que continuam a apresentar níveis de dor marcantes, ainda que estejam a receber o tratamento modificador da doença apropriado (232).

Os DMARDs não só permitem reduzir a atividade da doença, como também impedem a progressão da mesma, porém existem aspetos que nem mesmo esta classe de medicamentos consegue colmatar, como é o caso da dor, fadiga e função física (233).

No que concerne às terapêuticas anti-inflamatórias, verificou-se um avanço marcante, sobretudo na área dos Acs monoclonais, contra as diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1) (234). Todavia, a dor crónica é uma questão para a qual ainda não existe resposta (234). A terapêutica analgésica padrão (AINEs, opioides ou esteroides) está associada a graves efeitos colaterais (234). Assim sendo, embora a terapêutica atualmente utilizada para o tratamento da AR possa prevenir ou reduzir o dano articular e auxiliar na manutenção da estrutura e função regulares das articulações, apenas podem controlar o progresso da doença e, geralmente, estão associados a muitos efeitos adversos (235).

A SPR refere também que, para além da terapêutica farmacológica, o tratamento da AR deve envolver medidas não farmacológicas, como: doentes fumadores devem deixar de fumar; em indivíduos com excesso de peso é aconselhado a perda ponderal, para prevenir o desgaste articular e outras doenças, como hipertensão e diabetes; prática de exercício físico, porém sempre orientada pela equipa médica, sobretudo para fortalecimento muscular e manutenção da função articular (2). Além disso, existem outros tratamentos como a fisioterapia, em que o plano de reabilitação deve ser definido pelo seu Reumatologista ou Fisiatra, tendo em conta as articulações afetadas e a fase da doença em que se encontra (2).

#### 2.1.6.1.1- Anti-inflamatórios não esteroides

Os AINEs fazem parte dos fármacos mais prescritos para o tratamento desta patologia e estão frequentemente associados a diversas reações adversas, como complicações GIs, azotemia, disfunção plaquetária, rinite alérgica, agravamento da asma, erupção cutânea, toxicidade hepática e supressão da medula óssea (236).

O mecanismo de ação destes fármacos está direcionado para as isoenzimas da cicloxigenase (COX)-1 e -2 (232). Estes agem inibindo, especificamente, a ligação do ácido araquidónico à COX, o que inibe a produção de prostaglandinas (PG, do inglês prostaglandin), como a PGE<sub>2</sub>, um dos principais fatores que conduz à inflamação, dor e febre (237).

Existem 2 mediadores inflamatórios que desempenham um papel importante na AR e noutros distúrbios inflamatórios, o NO e as PGs (238). O primeiro é sintetizado a partir do aa L-Arg, por ação das enzimas NO sintetases (NOSs, do inglês Nitric Oxide Synthases), enquanto que as PGs são lípidos e estão envolvidas não só nas respostas inflamatórias, como na dor e no cancro, sendo a PGE<sub>2</sub> a principal responsável (238).

Ao inibirem as vias da COXs, tal como demonstrado na Figura 2.6, os AINEs permitem o alívio da dor artrítica, assim como reduzem a inflamação (239)(240). Estes fármacos apresentam uma grande utilidade no alívio da dor crónica associada a distúrbios musculoesqueléticos, como a AR e a OA (237). E, por isso, muitas das vezes, são recomendados como terapêutica de primeira linha nos distúrbios reumáticos das articulações (232).

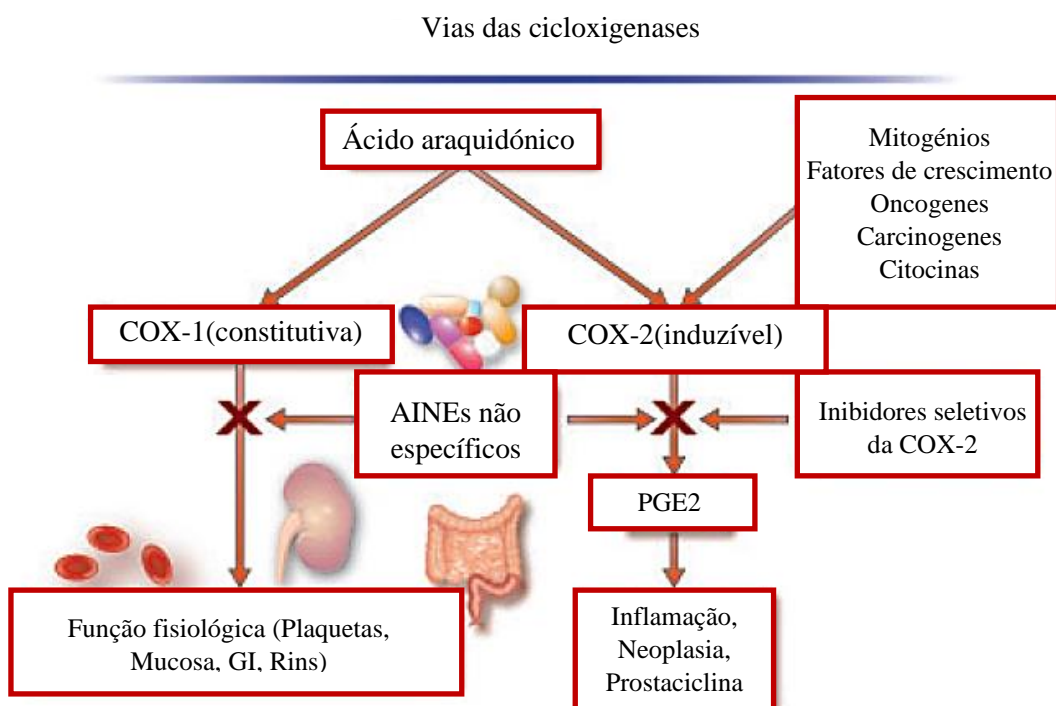
Os AINEs podem inibir seletivamente a COX-2, como o celecoxib, ou inibem inespecificamente as duas isoenzimas, como o ibuprofeno (238). O ibuprofeno, numa dose intermédia a elevada (10 mg/kg) está indicado no tratamento da dor e inflamação da DR (241). O diclofenac, numa dose intermédia, e a indometacina, em dose elevada, também se encontram indicados para essa condição (241).

A COX-1 exerce um papel nos vários processos fisiológicos, sendo sintetizada continuamente em todos os tecidos (238). Por outro lado, a enzima COX-2 é ativada após ser induzida e associa-se ao processo inflamatório e tumorigenicidade (238). Deste

modo, o bloqueio da síntese das PGs é uma forma promissora e prática de tratar doenças inflamatórias, como é o caso da AR (238).

Tal como se pode ver na Figura 2.6, os inibidores da COX-2 vão impedir a síntese de prostaciclina, podendo ampliar o risco de eventos CVs (239). Por outro lado, a inibição da COX-1, presente na mucosa gástrica, resulta em efeitos colaterais GIs (239). Deste modo, inibidores específicos da COX-2 permitem atenuar os efeitos gástricos, porém apresentam uma grande probabilidade de aumentar o risco CV (239). Assim sendo, embora sejam eficazes na parte sintomática da patologia, devem ser usados na dose mínima eficaz, pelo menor tempo possível, após uma avaliação dos riscos GIs, renais e CVs (242).

Figura 2.6- Demonstração das vias das cicloxigenases -1 e -2. Adaptado de (239).



Ainda que esta classe farmacoterapêutica seja capaz de proporcionar um alívio da dor e aliviar o edema e a rigidez das articulações, a mesma não é eficaz na alteração da progressão da doença (243).

#### 2.1.6.1.2- Glucocorticoides

Data de 1948, a primeira vez em que a um doente com AR foi-lhe administrado um GC, o que mais tarde, em 1950, viria a traduzir-se na atribuição do Nobel de Medicina a Kendall, Reichstein e Hench (244).

Os GCs fazem parte, juntamente com os mineralocorticoides, de uma classe de hormonas esteroides libertadas pelo córtex adrenal (245). Conhecidos pelos seus efeitos no metabolismo dos hidratos de carbono, os GCs regulam várias funções celulares, como o desenvolvimento, homeostase, metabolismo, cognição e inflamação (245). As suas funções, quer fisiológicas, quer farmacológicas, são desempenhadas pelo recetor glucocorticoide (GR, do inglês Glucocorticoid Receptor) (NR3C1) ubiquamente expresso, um fator de transcrição de ligação hormonal, da superfamília do recetor nuclear (246).

Os GCs são fundamentais, por exemplo, na manutenção da supressão da glicose no cérebro e nos RBCs, durante o jejum, estimulando a gliconeogénese (247). Quando em excesso, vão promover um desequilíbrio na homeostase da glicose que inclui resistência à insulina, intolerância à glicose e, dependendo da suscetibilidade individual, Diabetes Mellitus tipo II (DMT2) (247).

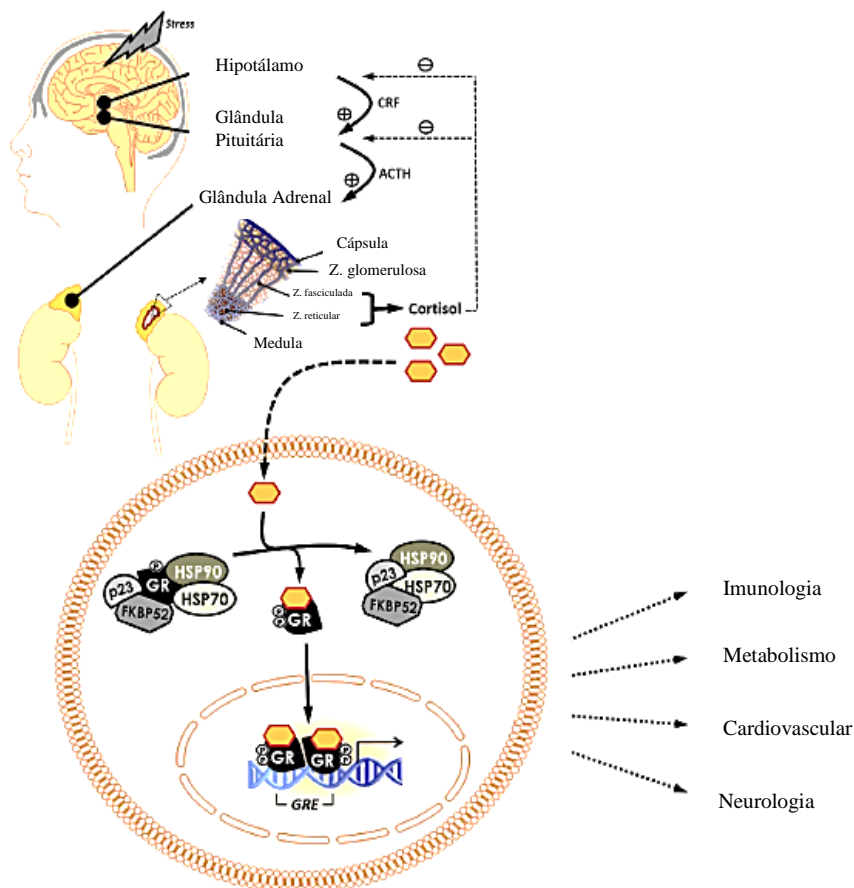
Está também demonstrado que os GCs aumentam a lipólise e a adipogénese, de forma simultânea, mas por diferentes vias (248)(249). A nível imunológico, sabe-se que estes exercem o seu efeito anti-inflamatório através da ligação aos GRs o que, por sua vez, conduz à supressão de reguladores pró-inflamatórios como o NF- $\kappa$ B ou a proteína ativadora 1 (AP1, do inglês Activator Protein 1) (250)(251).

Os GCs (no ser humano, cortisol) são sintetizados e libertados pelas glândulas suprarrenais segundo um ciclo circadiano, em resultado de sinais fisiológicos e do stress, após ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (245)(231). Em resposta a alterações nos níveis de glicose, ácidos gordos e hormonas, o jejum, a fome e a diabetes são entendidos pelo sistema neuroendócrino como stress (252). O sinal de stress faz com que o hipotálamo secrete o fator de libertação da corticotrofina (CRF, do inglês Corticotrophin Releasing Factor) que estimula a hipófise a produzir a hormona libertadora de adrenocorticotrofina (ACTH, adrenocorticotrophin-releasing hormone) (252). Este último, na corrente sanguínea, vai ativar as glândulas suprarrenais para a

síntese de hormonas (252). No caso do cortisol, a ACTH estimula as células fasciculadas e reticulares a produzi-lo a partir do colesterol (252).

O cortisol, a principal hormona do stress, tem ação em todas as células, onde reage negativamente à secreção de CRF e ACTH (252). O GR é ativado após ligação do GC, hiperfosforilado e é libertado do complexo inibitório (Figura 2.7) (252). Os GCs têm uma ação anti-inflamatória rápida e, atualmente, são também considerados modificadores de doença, uma vez que conseguem abrandar os danos estruturais(253).

Figura 2.7- Mecanismo de ação do glucocorticoide e do seu recetor. Adaptado de (252).



Na ausência de um tratamento apropriado e o mais precoce possível, surgem os danos articulares e incapacidade em resultado dos mesmos (254). Os DMARDs vieram demonstrar que o controle da doença (remissão ou LDA) é possível, porém os mesmos

podem levar semanas a desempenhar os seus benefícios terapêuticos, contrariamente aos GCs (254).

Deste modo, quando o doente inicia o tratamento com um DMARD, os GCs são coadministrados como “terapêutica de ponte”, ou seja, com o objetivo de colmatar o início de ação lento dos DMARDs (254)(255). Isto permite controlar a dor e a inflamação, rapidamente, enquanto se aguardam os efeitos destes últimos (256). Todavia, diversas sociedades de reumatologia aconselham a redução do GC logo que possível (256).

Segundo a ACR, a adição dos GCs deve ser feita em doses baixas ( $\leq 10$  mg/dia de prednisona ou equivalente), em pacientes com atividade da doença moderada ou alta, aquando do início da terapêutica com DMARDs e em pacientes em que haja falha do DMARD ou falha biológica (257). Ainda de acordo com a mesma fonte, pode considerar-se o uso de GCs a curto prazo (3 meses de tratamento) para crises da doença (257). Todavia, por forma a que haja uma melhor relação benefício-risco, a administração dos mesmos deve ser feita na menor dose e no menor tempo possíveis (257).

Há alguns anos, informações de bancos de dados Europeus deram a conhecer que perto de metade de todos os doentes com AR fazem terapêutica concomitante de GCs, por um período de tempo mais alongado, em doses inferiores a 7.5 mg/dia de equivalente de prednisona (244).

Existem estudos que afirmam que 2/3 dos indivíduos com a patologia fazem terapia com GCs, a fim de colmatar os sinais e sintomas, bem como impedir o dano estrutural articular (258). Todavia, estes estão associados a efeitos adversos, nomeadamente quando administrados numa dose superior a 7,5 mg e por um maior período de tempo (258). Um estudo realizado por Listing et al. demonstrou que, em indivíduos com doença persistente, muito ativa, e quando os mesmos eram tratados com doses superiores a 5 mg/dia de GCs, a taxa de mortalidade era maior (259).

Na forma oral, os GCs são utilizados como tratamento de ponte e, nos períodos de exacerbação, como um complemento (260). Todavia, é possível que o tratamento intra-articular apresente um maior benefício quando comparado ao tratamento sistémico, uma vez que permite assegurar que uma concentração elevada de GC vá para o local da inflamação (260).

Deste modo, visto que a administração intra-articular é feita em doses refratárias e na presença de articulações tumefactas, a mesma pode estar associada a menos efeitos colaterais, pois a dose acumulada é menor (260).

Embora esta classe de medicamentos tenha demonstrado eficácia no tratamento da AR, como já foi referido, a mesma é conhecida pelos seus efeitos adversos, tais como ganho de peso, osteoporose, hipertensão arterial, diabetes, eventos GIs, suscetibilidade a infeções, eventos CVs, glaucoma e tuberculose (253)(261). Assim sendo, surge a necessidade de descobrir novos agentes que, com uma eficácia equiparável, apresentem menos efeitos adversos (261).

#### 2.1.6.1.3- Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs

Nas últimas décadas, pacientes com AR experienciaram uma melhoria do prognóstico (262). Tal deveu-se à possibilidade de um diagnóstico precoce, um tratamento direcionado para a LDA ou remissão e, ainda, o uso de DMARDs em combinações, bem como a disponibilidade de terapias biológicas (262). Todavia, a despesa com o tratamento da AR aumentou drasticamente e, atualmente, encontra-se acima da diabetes, o que se deve sobretudo às terapias biológicas (262).

Esta classe de fármacos apresenta funções imunossupressoras e imunomoduladoras, podendo ser divididos em pequenas moléculas sintéticas ou biológicas, tal como se pode ver na Tabela 2.7 (12)(263).

Tabela 2.7- Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença. Adaptado de (12),

<b>MEDICAMENTOS ANTIRREUMÁTICOS MODIFICADORES DA DOENÇA</b>	
<b>CONVENCIONAIS SINTÉTICOS</b>	Metotrexato, sulfassalazina, hidroxicloroquina, leflunomida sintética, azatioprina
<b>BIOLÓGICOS</b>	Bloqueadores do TNF (infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab, certolizumab), Bloqueador co-estimulador de células T (abatacept), recetor anti-IL6 (tocilizumab); anti-CD20 (rituximab)
<b>DIRECIONADO SINTÉTICO</b>	Tofacitinib

Estes fármacos detêm um mecanismo de ação exclusivo que, em última análise, vai interferir com as vias críticas da cascata inflamatória (263). O uso dos mesmos de forma precoce, seja em monoterapia, seja em associação, pode prevenir danos articulares permanentes (264).

Os DMARDs são considerados a terapêutica de primeira linha no tratamento da AR e, destes, o MTX, um DMARD convencional sintético (csDMARD, do inglês conventional synthetic DMARD), é a escolha primária, uma vez que demonstrou capacidade em deter as evidências radiográficas da progressão da doença (265)(266). No entanto, perto de metade a 2/3 dos doentes que recorrem ao MTX em monoterapia não conseguem obter um controle razoável da patologia e, nestes casos, recomenda-se uma associação com um segundo csDMARD, um bDMARD, ou um DMARD sintético direcionado (tsDMARD, do inglês targeted synthetic DMARD) (267). O MTX apresenta uma elevada capacidade em suprimir a sinovite e restabelecer a função física (266).

Os efeitos terapêuticos e adversos dependem da dosagem administrada de MTX (268). Quando em baixa dose (<25-30 mg/semana) exerce ação anti-inflamatória, aumentando os níveis de adenosina no tecido (268). Porém, pode apresentar um efeito citotóxico antiproliferativo quando administrado em doses elevadas [ $\geq 500\text{mg/m}^2$  intravenoso (IV)] (268). Quando administrado em baixas doses para a AR, o MTX apresenta como principais efeitos adversos: efeitos GIs, hepatotoxicidade, erupção cutânea, alopecia e efeitos colaterais hematológicos (268).

Apesar da terapia combinada poder ser mais eficiente do que a monoterapia, foi demonstrado através de uma meta-análise que, doentes numa fase inicial da doença que não fazem MTX, a monoterapia com inibidores do TNF não foi tão eficiente quanto o MTX isolado (269). Por outro lado, a relação custo/benefício do MTX é mais benéfica, daí este continuar a ser o medicamento de eleição no tratamento da AR inicial (269). Além de que demonstrou reduzir a morbimortalidade da doença (264).

Ainda que os agentes biológicos tenham contribuído para um controlo eficaz da doença, o tratamento com um ou mais csDMARDs continua a ser o ponto de partida da terapêutica em indivíduos com AR (270). Além do mais, embora sejam eficazes, os agentes biológicos são bastante caros, quando comparados aos cDMARDs (do inglês, conventional DMARDs), o que se traduz numa responsabilidade económica não só a nível individual, como também para o sistema de saúde (271).

Os agentes biológicos têm alvos moleculares distintos, apresentando capacidade em aumentar o risco de infeções e neoplasias graves (272)(273). Os bloqueadores do TNF aparentam ter ações clinicamente distintas, ainda que tenham como alvo a mesma molécula (274). Os Acs anti-TNF foram um grande progresso na terapia desta doença, pois atingindo o TNF- $\alpha$  pode-se diminuir a inflamação e inibir eficientemente a progressão da AR (275). Dos agentes biológicos, estes são considerados a primeira linha de escolha (276).

O abatacept é uma proteína de fusão totalmente humana, solúvel, recombinante, que vai inibir, de uma forma seletiva, a ativação das células T, através da ligação ao CD80/CD86, bloqueando o CD28 nas APCs, vista como um sinal co-estimulatório, ou seja, um segundo sinal (277)(278). Portanto, ele vai modular seletivamente o sinal co-estimulatório CD80/CD86-CD28 necessário para a ativação total das células T, o que resulta na diminuição da proliferação de células T e redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (279).

O tocilizumab (TCZ) é um Ac monoclonal humanizado anti IL-6, o que significa que vai antagonizar os efeitos desta, impedido a sua ligação ao seu recetor (280)(281).

Quanto ao rituximab (RTX), um Ac monoclonal quimérico, este tem a sua ação direcionada para a molécula CD20 presente na superfície das células B, o qual demonstrou eficácia para o tratamento desta doença (273)(282)(283). Esta interação traduz-se na depleção das células B naïve, maduras e de memória, mas não das células

precursoras ou plasmáticas, provavelmente por uma combinação de citotoxicidade celular dependente de Acs, citotoxicidade dependente de complemento e apoptose (282). Todavia, 30-40% dos doentes, não apresentam uma resposta positiva a esta terapia (282).

Para que haja uma resposta celular, é necessário que ocorra transdução de sinal, o que vai permitir às células detetar citocinas no ambiente externo (284). Uma grande parte das citocinas envolvidas em DAs sinalizam através da via de sinalização JAK/STAT (285).

Medicamentos à base de moléculas pequenas, como os inibidores de proteínas cinases, aparentam ser uma alternativa apropriada para os bDMARDs, devido à sua capacidade de imunomodulação de diversas vias sinalizadoras intracelulares importantes (286). A família tirosina quinase citoplasmática não recetora JAK integra sinais de diversas citocinas (284).

O tofacitinib é um inibidor oral da JAK, inibindo principalmente a JAK1 e a JAK3 e, em menor grau, a JAK2 (287)(288). E, dado que as famílias JAK encontram-se associadas aos domínios citoplasmáticos de diversos recetores de citocinas, este fármaco pode bloquear a sinalização para essas citocinas (288). Portanto, citocinas subordinadas à via JAK/STAT (como a IL-6, IL-12, IL-21, entre outras) provaram ser importantes no desenvolvimento de DAs e inflamatórias, uma vez que desempenham um papel crucial no desenvolvimento, proliferação e função das células T, das quais faz parte os subconjuntos pró-inflamatórios das células T (Th1, Th2 e Th17) (285).

#### 2.1.6.1.4- Analgésicos

Pacientes com esta AR referem que a dor é o seu principal problema e que o seu controle é o principal objetivo (289). E, ainda que o tratamento com DMARDs seja a base da terapia, os analgésicos opioides são comumente prescritos para o tratamento da dor (289). É importante estar alerta ao iniciar a toma de opioides na ausência de fortes evidências que sustentem a hipótese de que o utente necessita fazê-los (13). Isto porque, este tipo de medicação pode criar dependência e, muitas vezes, é difícil interromper a sua toma (13).

A prescrição de analgésicos opioides tem sido cada vez mais elevada em utentes que apresentam dor crónica não associada a cancro, inclusive doentes com AR (290). Todavia, a segurança destes medicamentos, a longo prazo, continua a ser uma incógnita (290). O uso destes medicamentos traduz-se num aumento da morbimortalidade e, tal deve-se a episódios de overdose, eventos CVs, resultados respiratórios adversos, bem como infeções graves (291). A mortalidade associada à toma desta medicação também inclui acidentes com veículos, homicídios e agressões (13). Na AR, está associado não só ao aumento de infeções, como também de fraturas não vertebrais (13)(289)(290).

Os opioides regulam a nociceção, isto é, a resposta do sistema nervoso sensorial a estímulos potencialmente prejudiciais (292). Isto deve-se, sobretudo, à sua ação agonista nos recetores opioides, que são omnipresentes no Sistema Nervoso Central (SNC) e que se encontram nos terminais periféricos dos nervos aferentes (292). Portanto, eles vão inibir a libertação de neurotransmissores nos terminais aferentes primários da medula espinhal e ativam os controles inibitórios descendentes, o que conduz ao seu efeito analgésico (292).

Foi comprovado através de estudos experimentais em animais e *in vitro* que, alguns opioides (como a morfina, metadona e o fentanilo) têm a capacidade de suspender as respostas imunes e, dessa forma, aumentar a suscetibilidade a infeções (291). Porém, o mesmo não se verificou para a oxicodona, oximorfona e tramadol (291).

A exposição a certos opioides (como a morfina) relaciona-se com a redução na quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, assim como, inibição do complemento, de células NK e da atividade fagocítica (290). Porém, essas repercussões resultantes das propriedades imunossupressoras continuam duvidosas (290).

#### 2.1.6.2- Fitoterapia

A medicina baseada na fitoterapia tem capacidade para fornecer tratamentos eficazes para patologias inflamatórias, especialmente para a AR ou OA (293). Tradicionalmente, uma diversidade de espécies de plantas foram regularmente e,

independentemente, selecionadas por várias culturas em todo o mundo, devido aos seus efeitos analgésicos e/ou anti-inflamatórios (293).

A nível mundial recorrem a suplementos botânicos com a expectativa de aumentar a resposta imunológica e minorar os sintomas relacionados com os agentes patogénicos (294). Para uma grande parte da população mundial, sobretudo os indivíduos que residem nos países do terceiro mundo, o recurso a medicamentos à base de plantas é a única opção (294). Em 1985, a Organização Mundial da Saúde (OMS) fez uma estimativa de que, talvez 80% da população em todo o mundo recorresse a plantas para suprimir as suas necessidades de cuidados de saúde primários (294).

A Fitoterapia é definida como: “um sistema de medicina que utiliza vários remédios à base de plantas e dos extratos “totais” de plantas, para tratar problemas (recuperar a saúde) e manter uma boa saúde (prevenção)” (295). A proporção de pacientes que usam Medicina Complementar e Alternativa (MCA) tem aumentado recentemente (296). Em pacientes com AR, a prevalência do uso de MCA varia de 28% a 90% (296). Além disso, tem sido demonstrado que a MCA usada com mais frequência inclui produtos biológicos, como o mel e medicamentos à base de plantas (296). Recentemente, 90% dos pacientes com artrite utilizaram terapias alternativas, como medicamentos à base de plantas (296).

Como já foi referido, a terapêutica medicamentosa atualmente disponível para o tratamento da AR é composta por uma variedade de medicamentos (297). Todavia, a mesma está associada a elevados custos e a reações adversas não desprezáveis, como distúrbios GIs, CVs e imunodeficiência (297)(298).

Em Portugal, segundo a Rede Nacional de Especialidade Hospitalar e de Referenciação de Reumatologia, em 2015, o número médio de medicamentos prescritos a um indivíduo com doença reumática e músculo-esquelética (DRM) foi de 2,5, enquanto a média nos indivíduos sem DRM foi de 0,5 (35). As estimativas de despesa individual de saúde eram de cerca de 500 euros por ano nos doentes com DRM e de 250 euros nos indivíduos sem DRM (35).

Na AR existe um vínculo entre a inflamação e o aumento da renovação óssea e, apesar da disponibilidade de uma gama de medicamentos convencionais, estes podem não apresentar um efeito terapêutico na inflamação e no dano ósseo em simultâneo (299). Deste modo, tratamentos alternativos ou auxiliares, baseados em produtos

vegetais naturais são bastante procurados para esta patologia e outros distúrbios (297). Além de que surge, também, a necessidade em encontrar novos agentes antiartríticos, que possam atuar nas duas vertentes, isto é, inibir tanto a inflamação como o dano ósseo, e definir os seus mecanismos de ação (299).

Os produtos vegetais naturais podem ter a vantagem de apresentar toxicidade limitada, porém ainda existe ceticismo quanto à sua utilização, em parte, pela falta de informações sobre o seu mecanismo de ação (297). Todavia, os cientistas têm dispensado uma grande atenção às terapias à base de plantas para o tratamento da AR, uma vez que estas possuem atividade anti-inflamatória/antioxidante e efeitos colaterais mínimos (298).

Nos EUA foi promovido o uso de remédios à base de plantas para o tratamento da artrite, nomeadamente, após retirada dos anti-inflamatórios aprovados pela FDA (do inglês Food and Drug Administration) (298). A patogénese da AR ainda permanece incerta e a mesma não apresenta cura (300). Assim, há necessidade de novos medicamentos, baratos e que sejam bem tolerados, para que possa haver um tratamento eficaz sem efeitos colaterais (300). Deste modo, acredita-se que os fármacos de origem vegetal possam ser uma estratégia alternativa para o controle eficaz dos sintomas da AR, particularmente, compostos como flavonoides, terpenos, catequinas, alcaloides, antocianinas e antoxantinas, todos os quais são conhecidos por prolongar os efeitos antioxidantes, pela capacidade em modular a expressão de sinais pró-inflamatórios e exibir potencial contra a artrite (300).

De facto, as plantas são recursos valiosos para uma vasta gama de metabolitos secundários, os quais detêm atividades medicinais e farmacêuticas (301). A revisão elaborada por Dudics et al., em 2018, apresenta um resumo da validação de alguns produtos naturais comumente utilizados na terapia da artrite, alguns dos quais irão ser abordados ao longo desta dissertação, como o *Tripterygium wilfordii* Hook F, *Boswellia serrata* Roxb.ex Colebr., *Harpagophytum procumbens* Burch.DC. ex Meisn., *Curcuma longa* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Urtica dioica* L. e a *Rosa canina* L. (302).

Os componentes bioativos que derivam das plantas ou outros produtos naturais, exercem os efeitos biológicos em resultado do controlo que exercem sobre os mediadores moleculares de inflamação, como o NF-κB e o STAT3 (303)(294)(304)(305). Além disso, também têm capacidade de suprimir enzimas pró-

inflamatórias, como a COX-2 e a 5-lipoxigenase (5-LOX) (306)(307)(308). Por outro lado, podem modular o equilíbrio Th17/células T reguladoras (Treg, do inglês T regulatory cells) controlando os níveis relativos das citocinas principais, por exemplo, a IL-6 e certos fatores de transcrição, como o recetor órfão gama relacionado com RAR (ROR $\gamma$ t, do inglês RAR-related orphan receptor  $\gamma$ t) e o Foxp3 (do inglês, forkhead box P3) (305)(307). Do mesmo modo, atuando por meio de algumas citocinas, como a IL-17, e outros mediadores, como do ativador do recetor do ligante fator nuclear kappa-B (RANKL, do inglês receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), os produtos naturais conseguem não só afetar a resposta das células T, como também o cross-talk osteoimune e a saúde óssea (297)(299).

Em suma, os produtos naturais com as propriedades acima mencionadas apresentam um grande potencial como agentes terapêuticos para a AR, quer sejam isolados, quer em combinação com certos fármacos antiartríticos convencionais (302).

#### 2.1.6.2.1- Terpenóides e Terpenos

Os terpenos e as suas formas oxigenadas denominadas terpenóides, são considerados a classe de produtos naturais mais vasta, contando com mais de 55.000 estruturas diferentes descritas, resultantes do metabolismo especializado das plantas (309)(310). Estes compostos representam as biomoléculas mais antigas conhecidas e fazem parte da composição das fragrâncias voláteis florais e de frutos (309). Os terpenóides apresentam um grande interesse, devido às suas aplicações nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética (310). A sua classificação baseia-se no número e na organização estrutural dos carbonos formados pelo arranjo linear das unidades de isopreno, seguido pela ciclização e rearranjos do esqueleto do carbono com uma característica empírica conhecida como regra do isopreno (311). Embora apresentem uma diversidade de estruturas e funções, todos os terpenos e terpenóides derivam do bloco de construção comum de 5 carbonos, o isopreno [2-metilbuta-1,3-dieno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)] (309).

Assim sendo, a unidade simples de isopreno representa a classe mais básica dos terpenóides, os hemiterpenoides (311). Segundo a regra do isopreno, todos terpenóides

derivam da união ordenada “cabeça com cauda” de unidades de isopreno, mas pode haver exceções (311). Os precursores terpenóides universais, dimetilalil difosfato (DMAPP), e isopentil pirofosfato (IPP) resultam de vias metabólicas distintas (312). A primeira via, a via do mevalonato (MVA, do inglês mevalonate), é de origem arquea/eucariótica, ao passo que a segunda via, a via do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP, do inglês 2-C-Methyl-D-Erythriol 4-Phosphate), encontra-se sobretudo na maioria das bactérias, cianobactérias, microalgas verdes e plastídios vegetais (312).

Hemi-, mono-, di- e tetraterpenóides são sintetizados principalmente pela via do MEP, ao passo que os sesqui- e triterpenóides são sintetizados pela via do MVA, embora hajam exceções e interferência entre as duas vias (311).

A planta *Tripterygium wilfordii* Hook F, amplamente empregue na medicina tradicional chinesa, ultimamente tem sido utilizada como tratamento para DAs, inclusive a AR (313). A sua bioatividade, em boa parte, pode dever-se à presença do triptólido, um diterpenóide e poderoso imunossupressor (313).

Um produto natural amplamente utilizado na medicina ayurvédica tradicional é a gomorresina de *Boswellia serrata*, que contem diferentes tipos de metabolitos secundários, como óleos essenciais, sesquiterpenóides, diterpenóides e triterpenóides (314)(315). Entre estes, os compostos mais abundantes são os triterpenóides, como os ácidos bosvélicos (BA, do inglês Boswellic Acid), triterpenóides pentacíclicos, dotados de uma potente atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, anti-tumoral e hipolipidémica (314)(315).

Evidências apontam para o ácido 3-*O*-acetil-11-ceto- $\beta$ -bosvélico (AKBA, do inglês 3-*O*-acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswellic Acid) como o principal constituinte da *Boswellia serrata* (316). Os BAs possuem um padrão inibitório não oxidativo, seletivo para a via da 5-LOX, a principal via de produção de leucotrienos a partir do ácido araquidónico, o que promoveria doenças inflamatórias crónicas (316). O AKBA tem atividade contra uma variedade de doenças inflamatórias, de entre as quais, a AR (316).

As propriedades medicinais de *Harpagophytum procumbens* devem-se, sobretudo, à presença de glicosídeos iridóides, dos quais fazem parte o harpagósido, o harpagido, o procumbido, entre outros (317). Porém, do ponto de vista farmacológico, os glicosídeos feniletanoides, o verbascosídeo e o isoverbascosídeo, são considerados constituintes interessantes (317).

Os glicosídeos iridóides são considerados os constituintes farmacologicamente ativos predominantes, presentes em *Harpagophytum procumbens*, e são os principais responsáveis pelas suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antirreumáticas (318).

Os iridóides são um grande grupo de monoterpenóides, que possuem esqueletos nos quais um anel de seis membros contém um átomo de oxigénio, fundido a um anel ciclopentano (311). Estes compostos surgem nas plantas, mais frequentemente, associados a um açúcar, sendo assim classificados como glicosídeos, e são divididos em quatro grupos, dos quais faz parte os glicosídeos iridóides (311).

#### 2.1.6.2.1.1- *Tripterygium wilfordii* Hook F

Os extratos das raízes de *Tripterygium wilfordii* Hook F, uma planta tradicional chinesa, também conhecida por “Lei Gong Teng” e “Videira trovão de Deus”, pertence à família *Celastraceae* e é considerada um dos tratamentos sistémicos mais comuns para distúrbios autoimunes, inclusive a AR (319)(320)(321). Há mais de mil anos que a mesma tem sido utilizada para o alívio da dor articular na China e, recentemente, foi comprovado que os seus extratos são eficazes em pacientes com AR (320).

A partir dos extratos de *Tripterygium wilfordii* Hook F foram identificados cerca de 380 metabolitos, dos quais 95% são terpenóides (322)(321). Os diterpenóides triptólido, triptidiólido e triptonídeo são os mais abundantes e os responsáveis pelas propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias desta planta, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*, o que a torna útil em DAs e inflamatórias (322)(321)(323). Todavia, o triptólido, um diterpeno triepóxido, é o componente ativo principal extraído desta planta (324). É importante referir que uma grande parte das funções anti-inflamatórias e imunorreguladoras dos extratos de *Tripterygium wilfordii* Hook F deve-se à capacidade dos principais diterpenóides em suprimir a transcrição de citocinas e outros genes pró-inflamatórios (325).

As ações anti-inflamatórias foram atribuídas à inibição da COX-2 e PGE2 nos fibroblastos e outros tipos de células (326). Por outro lado, existem evidências de que o triptólido suprimiu a expressão génica e a produção de pro-MMPs-1 e -3, e aumentou a

expressão génica dos inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs, do inglês tissue inhibitors of metalloproteinases)-1 e -2, nos SFs (326). Além disso, verificou-se também, que o triptólido inibiu a expressão do gene *MMP-13* nos condrócitos humanos e de bovinos (326). Foi ainda relatado que o *Tripterygium wilfordii* Hook F pode inibir a expressão de genes pró-inflamatórios, como os da IL-2, monóxido de azoto sintetase induzível (iNOS, do inglês inducible Nitric Oxide Synthase), TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (325). Também se observou inibição da expressão induzida por TNF- $\alpha$ , dos genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-8*, o que demonstrou a capacidade anti-inflamatória do triptólido nos FLSs (327). Além do mais, pode também inibir a formação de OCs, evitando a destruição óssea, ao reduzir a expressão do RANKL e do ativador do recetor do fator nuclear kappa-B (RANK, do inglês receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B), aumentando a expressão da osteoprotogerina (OPG) (304).

A OPG, como recetor, é um membro da família relacionada ao TNF e tem um papel fundamental na regulação do metabolismo ósseo (328). Esta vai inibir a diferenciação e ativação dos OCs e aumentar a apoptose dos mesmos, exercendo um papel protetor na destruição óssea (328).

O estudo feito por Goldbach-Mansky et al., em 2009, comparou os efeitos benéficos e colaterais entre o extrato de *Tripterygium wilfordii* Hook F e a sulfassalazina no tratamento da AR ativa, demonstrando que o extrato padronizado das raízes de *Tripterygium wilfordii* Hook F durante o tempo de estudo foi eficaz e seguro no tratamento de doentes com AR ativa (321). No mesmo estudo, verificou-se uma rápida melhoria nos sinais e sintomas clínicos (dor e tumefação nas articulações, e medidas de bem-estar geral) e em marcadores de inflamação (PCR, ESR e citocina pró-inflamatória IL-6), portanto o seu efeito anti-inflamatório pode tornar esta planta uma alternativa aos agentes atualmente disponíveis (321). Verificou-se, também, uma melhoria estatisticamente significativa maior para o *Tripterygium wilfordii* Hook F, comparativamente à sulfassalazina, no que respeita ao alcance de resposta ACR 20 (41.7% vs 24.6%), ACR 50 (33.3% vs 11.5%) e ACR 70 (23.3% vs 11.5%), e uma melhoria, moderada a boa, na pontuação da atividade da doença (DAS, do inglês Disease Activity Score) 28 (69.5% vs 42.6%) (321).

Para alcançar o ACR 20, os doentes teriam de apresentar uma melhoria de 20% em 24 semanas, conforme definido pelos critérios ACR (321). Para atender aos critérios, um paciente deveria ter uma melhoria igual ou superior a 20% nas articulações

doloridas e tumefactas (tendo sido avaliadas 68 doloridas e 66 tumefactas) e em 3 ou mais dos seguintes parâmetros: avaliação do médico ou paciente do estado de saúde global, avaliação da dor do paciente numa escala visual analógica (VAS, do inglês Visual Analogic Scale), a avaliação da função do paciente (usando uma versão modificada do questionário de avaliação de saúde [HAQ, do inglês Health Assessment Questionnaire]) e o nível sérico de PCR (321). Deste modo, a melhoria nos marcadores clínicos e laboratoriais, significou uma melhoria clínica considerável ao nível da função do paciente, medida pelo score de incapacidade HAQ (321).

No ensaio clínico randomizado e controlado, realizado por Lv et al., em 2014, o objetivo foi comparar a eficácia e segurança de *Tripterygium wilfordii* Hook F com o MTX, no tratamento da AR ativa (325). Para tal, 207 pacientes com AR ativa foram submetidos a um tratamento com 12,5 mg de MTX uma vez por semana, ou 20 mg de *Tripterygium wilfordii* Hook F três vezes ao dia, ou os dois em combinação (325). Os resultados obtidos indicaram que a monoterapia com *Tripterygium wilfordii* Hook F e a monoterapia com MTX apresentaram uma eficácia análoga (325). Todavia, a terapia combinada de MTX com *Tripterygium wilfordii* Hook F apresentou maior eficácia do que a terapêutica em monoterapia com o MTX, tal como se pode concluir pelos seguintes critérios: ACR20, ACR50, ACR70, boa resposta do índice clínico de atividade da doença (cDAI, do inglês clinical Disease Activity Index), boa resposta da EULAR, taxa de remissão e taxa de LDA na semana 24 (ACR 20: 92,8% vs 63,8%; ACR50: 76,8% vs 46,4%; ACR70: 43,5% vs 23,2%; boa resposta cDAI: 87,0% vs 52,2%; boa resposta EULAR: 58,0% vs 26,1%; DAS28 <2,6: 49,3% vs 20,3%; e taxa de LDA: 55,1% vs 27,5%) (325). Quanto à segurança, este estudo demonstrou que, a frequência total de efeitos adversos e os eventos adversos graves da monoterapia com *Tripterygium wilfordii* Hook F não foram significativamente maiores do que os da monoterapia com MTX, excetuando a frequência ligeiramente aumentada de menstruação irregular (325). Posto isto, concluiu-se que remédios à base de *Tripterygium wilfordii* Hook F conceberam melhores resultados terapêuticos do que os DMARDs isolados no controle dos sintomas da AR ativa (325).

Um outro componente ativo isolado de *Tripterygium wilfordii* Hook F é o celastrol, um triterpeno pentacíclico natural, que apesar de ter a sua eficácia clínica comprovada, não se sabe por qual mecanismo o mesmo exerce a sua ação (329)(330)(331). Este composto é dotado de múltiplos efeitos farmacológicos, tendo

mostrado um potente efeito anti-inflamatório em vários modelos de doenças (331). Recorrendo ao modelo de artrite induzida por adjuvante (AA, do inglês *adjuvant-induced arthritis*) em ratos, Venkatesha et al., em 2011, demonstraram que o celastrol possui uma potente atividade antiartrítica (297). O celastrol atenuou a gravidade da AA, assim como suprimiu a resposta de citocinas pro-inflamatórias (por exemplo, IL-17 e IL-6) (297). Além disso, suprimiu os níveis séricos de ACPAs, bem como a atividade da MMP-9 (297).

Fang et al., em 2017, isolaram e purificaram FLSs de dois tecidos sinoviais de pacientes com AR, para estudos *in vitro* (329). Verificaram que o tratamento com celastrol pode atenuar a proliferação e invasão dos RASFs ativados, evidenciando o papel do mesmo na AR (329). No mesmo estudo mostraram que a expressão gênica de quimiocinas específicas, recetores de quimiocinas e aqueles envolvidos na atividade de quimiocinas foi significativamente reduzida pelo tratamento com celastrol nos RASFs (329). As quimiocinas promovem a infiltração e ativação de leucócitos, angiogénese, diferenciação de OCs, proliferação e ativação de sinoviócitos, e participam na geração de dor regulando a libertação de neurotransmissores (329). Além do mais, a via de sinalização NF- $\kappa$ B foi fortemente modulada pelo tratamento com o celastrol nos RASFs, atenuando a ativação e translocação de NF- $\kappa$ B p65(329). Esta via é conhecida por estar envolvida na regulação de muitas citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas, recetores e enzimas adaptativas (329). Portanto, a atividade imunossupressora deste composto deve-se, pelo menos, parcialmente, a esta via de sinalização (329).

Foi investigado por Astry et al. o efeito do celastrol no equilíbrio Th17/Treg nas articulações (305). As células T desempenham um papel essencial no processo da doença, na autoimunidade, isto é, as células Th17 conduzem a inflamação patogénica, ao passo que as Treg demonstraram um efeito protetor nas DAs (305). Deste estudo, os autores concluíram que o celastrol pode limitar diretamente a diferenciação de Th17, mas melhorar a geração de Treg ao impedir a ativação de STAT3 (305). Além do mais, pode limitar a produção de IL-6 e IL-1 $\beta$ , reduzindo indiretamente a diferenciação de Th17 (305). O efeito do celastrol em células Th17 e Treg oferece uma vantagem sobre compostos ou fármacos que inibam apenas as células Th17 (305). Por outro lado, este composto visa a migração celular para o tecido sinovial (305). Portanto, este composto pode ser utilizado como um auxiliar ou uma alternativa aos cDMARDs (305).

Nanjundaiah et al. investigaram a influência do celastrol no dano ósseo em articulações artríticas de ratos com AA, e avaliaram os mecanismos envolvidos na inibição da remodelação óssea mediada por inflamação (299). O estudo permitiu concluir que o celastrol inibiu o dano ósseo induzido por inflamação, através da modulação do cross-talk osteoimune (299). Essa modulação resulta da inibição das principais citocinas pró-inflamatórias (produzidas pelas células imunes) que estimulam a produção de RANKL e aumentam a razão RANKL/OPG, o que se traduziria numa eventual osteoclastogênese (299). Por outro lado, resulta da inibição do nível/atividade da enzima de degradação da matriz MMP-9, a biomolécula efetora produzida pelas citocinas pró-inflamatórias, bem como do RANKL (299). E ainda, do efeito exercido sobre os dois conjuntos de mediadores referidos (citocinas pró-inflamatórias e a MMP-9), o que resulta na redução do número de OCs (299). Ou seja, o celastrol vai atuar por meio da redução dos mediadores-chave da osteoclastogênese, alterando a sua proporção a favor da atividade anti-osteoclástica e suprimindo os indutores principais a montante, bem como os efetores a jusante, dos mediadores osteoclastogénicos (299). Portanto, este composto apresenta potencial para ser utilizado no tratamento concomitante da inflamação e do dano ósseo associado à artrite (299).

#### 2.1.6.2.1.2- *Boswellia serrata* Roxb.ex Colebr.

*Boswellia serrata* ou Incenso da Península Arábica, pertence à família *Burseraceae* e é normalmente cultivada na Índia, norte de África e Médio Oriente (332)(333)(334). Esta espécie caracteriza-se pela produção de uma resina aromática, à qual se dá o nome de incenso (335). Desde há milhares de anos que o incenso tem demonstrado utilidade em diversas culturas, não só pela sua atividade desinfetante e refrescante de ar, como também no combate de odores desagradáveis e para fins cerimoniais (336). Por outro lado, a óleo-goma-resina da casca desta árvore tem sido utilizada também, desde a antiguidade, nas preparações ayurvédicas, como agente anti-inflamatório (337)(338)(339). Do género *Boswellia* apenas algumas espécies produzem resinas (340)(341). As resinas utilizam-se como incensos, mas também com finalidade terapêutica, ao passo que, quando destiladas em óleos essenciais, têm utilidade,

sobretudo, na perfumaria, aromaterapia e indústria alimentar, como é o caso do óleo de *Boswellia serrata* (340)(341).

Não data de há muito tempo que as atividades anti-inflamatória, antiartrítica e analgésica do extrato da óleo-goma-resina ganharam importância (342). Nas populações Asiática e Africana o incenso indiano tem sido utilizado na medicina para o tratamento da artrite (343).

Para a extração do exsudado resinoso fazem-se incisões nas cascas dos troncos das árvores envelhecidas, a goma exala e solidifica, em resultado da exposição ao ar livre, originando uma goma-resina castanha-alaranjada, conhecida por olíbano indiano, Salai Guggal ou, mais comumente, incenso indiano (335)(343)(344).

O óleo, dotado de um cheiro amadeirado e picante, de modo geral, obtém-se por destilação a vapor, a partir da goma-resina de incenso, sendo um dos óleos essenciais mais importantes a nível comercial, presente no mercado internacional (335).

A medicina tradicional faz uso da resina para o tratamento de patologias respiratórias e de diversos distúrbios inflamatórios, tais como a artrite, asma, colite, doença de Crohn, cancro, hiperlipidemia e psoríase, sendo vista com uma possível alternativa à terapêutica com AINEs (345)(346). A óleo-goma-resina é composta por óleo essencial (5-9%), hidratos de carbono (21-22%) e resina pura (65-85%) (344). Esta última contém ácidos triterpênicos tetra- e pentacíclicos, dos quais os fazem parte os BAs, que são os compostos bioativos mais relevantes (344).

A ação anti-inflamatória é atribuída, principalmente, ao grupo de triterpenóides pentacíclicos, chamados BAs, presentes na resina de *Boswellia serrata*, sendo considerados os seus princípios ativos (347)(343)(348). Os terpenóides são, sem dúvida, os metabolitos presentes em maior quantidade nesta resina (343)(315). Foram identificados, por autoria de Büchele e Simmet em 2003, 12 triterpenóides pentacíclicos diferentes na resina de incenso, inclusive os BAs (336).

Os BAs exercem o seu efeito anti-inflamatório ao interferirem com as cascatas inflamatórias, por inibição das várias enzimas envolvidas, assim como da COX, prostaglandina microssómica E-sintase-1 (mPGES-1, do inglês microsomal Prostaglandin E Synthase-1) e da via do NF- $\kappa$ B (349). Eles atenuam a produção de citocinas pró-inflamatórias reguladas pelo NF- $\kappa$ B (306). Por outro lado, os extratos da

resina e alguns dos seus princípios ativos inibem a libertação de citocinas pelos monócitos, macrófagos e linfócitos, inclusive as ILs pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6), bem como o INF- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  (336)(350).

Segundo alguns autores, a ação anti-inflamatória dos BAs deve-se, sobretudo, ao bloqueio não redox e não competitivo, específico, da enzima pró-inflamatória 5-LOX, que está presente nos neutrófilos, exercendo um papel na conversão do ácido araquidónico em ácido 5-hidroxieicosatetraenóico (5-HETE) e leucotrienos (306)(351). Estes últimos são responsáveis pela vasoconstrição, broncoconstrição, aumentam a permeabilidade vascular e a quimiotaxia (351).

A *Boswellia serrata* apresenta 4 importantes BAs, o ácido  $\alpha$ -bosvélico ( $\alpha$ BA, do inglês  $\alpha$ -Boswellic Acid), ácido  $\beta$ -bosvélico ( $\beta$ BA, do inglês  $\beta$ -Boswellic Acid), ácido 11-ceto- $\beta$ -bosvélico (KBA, do inglês 11-keto- $\beta$ -Boswellic Acid) e o AKBA (352). Estudos *in vitro* referiram que o KBA e o AKBA são os principais responsáveis por uma inibição mais acentuada da 5-LOX, o que significa, portanto, que há uma redução de leucotrienos como mediadores lipídicos inflamatórios (353). Porém, ainda assim, o AKBA, de todos eles, é o agente anti-inflamatório mais ativo e potente (354).

Um estudo realizado por Ismail et al. avaliou o potencial anti-inflamatório de *Boswellia serrata* (355). Para tal formaram 5 grupos de ratos albinos Wistar, em que o primeiro apenas era tratado com carragenina (controlo), o 2º, 3º e 4º grupos eram tratados com 50, 100 e 200 mg/kg/peso corporal (pc) respetivamente, e o grupo 5 era tratado com um fármaco padrão, a indometacina a 10 mg/kg/pc (355). O edema da pata induzido por carragenina e o estudo histopatológico da mesma, foram os métodos utilizados para avaliação experimental (355). O volume do edema da pata foi observado em intervalos de uma hora, tendo-se verificado maior após 5 horas (355). Houve uma diminuição significativa do edema, sendo maior para concentrações mais elevadas (200 mg/kg/pc), em comparação com a indometacina (35.97% vs 31.21%) (355). Além disso, no estudo histológico, os autores verificaram uma diminuição mais acentuada dos infiltrados celulares quando os ratos eram tratados com a concentração de 200 mg/kg/pc de *Boswellia serrata*, comparativamente à indometacina (355). Portanto, os resultados comprovam o potencial anti-inflamatório de *Boswellia serrata* e apoiam o seu uso na medicina tradicional como medicamento anti-inflamatório à base de plantas (355).

Um outro estudo teve como finalidade avaliar a atividade antiartrítica do extrato de *Boswellia serrata*, na artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund's (CFA, do inglês Complete Freund's Adjuvant) em ratos (356). Para tal, dividiram os ratos em 6 grupos, aos quais foi administrada uma injeção intradérmica de CFA na pata traseira (356).

Neste estudo, verificou-se que a dose maior de *Boswellia serrata* (180 mg/kg) demonstrou ser mais eficaz que as outras doses (45 e 90 mg/kg), pois apresentou uma melhoria no pc, redução da espessura da pata, redução do diâmetro do tornozelo, redução do volume da pata e redução do índice artrítico, para a inflamação aguda na AR (356). Todavia, demonstrou ser menos eficaz que o fármaco padrão, que apresentou um bom efeito anti-inflamatório (356). Além do mais, verificou-se que, qualquer que fosse a dose de *Boswellia serrata*, esta não causava qualquer alteração significativa nos níveis séricos do TNF- $\alpha$ , contrariamente à indometacina ( $P < 0.05$ ) (356).

Contrariamente ao estudo anterior, o estudo realizado por Umar et al. demonstrou que a administração de *Boswellia serrata per os* numa concentração de 200 mg/kg reduziu os níveis de IL-1 ( $p < 0,001$ ), IL-6 ( $p < 0,001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), IFN- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) e PGE2 ( $p < 0,01$ ) (10). No mesmo estudo, o qual recorreu ao método da artrite induzida por colagénio (CIA, do inglês Collagen Induced Arthritis), em ratos machos Wistar, o objetivo era avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória do extrato da resina de *Boswellia serrata* (10). O extrato de *Boswellia serrata* não só teve efeito nos mediadores inflamatórios, tal como já foi referido, como também acarretou modificações significantes em todos os outros parâmetros estudados (elastase articular, mieloperoxidase (MPO), NO, entre outros) (10). Um efeito significativo foi na redução do edema da pata traseira após 14 dias, comparativamente aos ratos com artrite, assim como minorou a atividade da doença (10).

#### 2.1.6.2.1.3- *Harpagophytum procumbens* Burch.DC. ex Meisn.

*Harpagophytum procumbens* Burch.DC. ex Meisn. ou garra do diabo, planta de garra, aranha-da-floresta e harpago, nomes comuns pelos quais esta planta é conhecida, pertence à família *Pedaliaceae* que, normalmente, é encontrada nas regiões do deserto

de Kalahari, no Sul de África (Namíbia, República da África do Sul, Botswana e Zimbabué) (357)(358)(359).

As raízes tuberosas secundárias desta planta têm várias aplicações terapêuticas possíveis (360). Na África do Sul, é tradicionalmente utilizada como um tônico amargo e estomacal, além de apresentar utilidade também como um tratamento para a febre, gota, mialgia e artrite (361). *Harpagophytum procumbens* contém glicosídeos iridóides (o harpagósido, o harpagido e o procumbido), flavonoides (como a luteolina e o campferol), fitoesteróis (principalmente o  $\beta$ -sitosterol), açúcares (sobretudo, a estaquiose, que é um tetrassacarídeo), triterpenóides (ácidos oleanólico e ursólico) e ácidos aromáticos (cafeico, cinâmico e clorogínico) e aas (362)(363)(364)(359).

Os glicosídeos iridóides, os principais componentes presentes nos tubérculos da planta, são aqueles que exercem as ações anti-inflamatória e analgésica, sendo por isso considerados como as principais substâncias ativas da planta (362)(364)(359). A parte com valor terapêutico da planta são as raízes tuberosas secundárias que contêm 0.5-3% de glicosídeos iridóides, dos quais o harpagósido é o iridóide principal (365). As preparações dos tubérculos secos de *Harpagophytum procumbens* apresentam-se úteis, sobretudo, na medicina moderna, assim como em produtos de saúde, em doentes que sofrem de DRs e artríticas, com o intuito de aliviar a dor articular e a inflamação (361). Ensaio clínico referem que os extratos dos tubérculos desta planta são ativos no tratamento da AR degenerativa, OA, tendinite, inflamação renal e doença cardíaca (366).

O estudo elaborado por Ouias e Heard, em 2009, tinha como finalidade avaliar a atividade anti-inflamatória de *Harpagophytum procumbens* e, para tal utilizaram vários métodos com o objetivo de investigar os seus efeitos sobre a COX-2, PGE-2, além da expressão da 5-LOX e da enzima iNOS (367). Recorrendo ao modelo de pele *ex vivo*, testaram a possibilidade dos principais componentes farmacologicamente ativos de *Harpagophytum procumbens* poderem originar respostas anti-inflamatórias, em tecidos mais profundos, após administração transcutânea (367). Todos os glicosídeos permearam a pele, porém os níveis de harpagido na fase do recetor foram, notavelmente, mais elevados do que os restantes (367). No que respeita ao efeitos dos componentes permeados, a sua análise foi feita por determinação da inibição relativa das expressões da COX-2, 5-LOX e da iNOS (367). Os resultados mostraram uma redução bastante significativa da expressão da COX-2 após 6 h, comparativamente ao

controle e aos componentes permeados (367). Por outro lado, não se observou qualquer efeito nas quantidades produzidas de 5-LOX e, no caso da iNOS, os resultados obtidos não foram significativos (367).

Este estudo sustenta a eficácia transcutânea desta planta na inibição da expressão de COX-2 e na inibição da produção de PGE-2, os quais tem um papel crucial na cascata inflamatória do ácido araquidônico (367). Isto indica que a mesma pode tratar a inflamação em tecidos mais profundos, como na artrite (367).

Segundo a Farmacopeia Europeia, os produtos comerciais de *Harpagophytum procumbens* devem incluir pelo menos 1,2% de harpagósido, o qual é o principal responsável pela eficácia anti-inflamatória de plantas que o contêm (368). Acredita-se que este atue por meio da inibição da produção de citocinas inflamatórias induzida por lipopolissacáridos (LPSs), como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e o TNF- $\alpha$ , resultante da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  e da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B em células RAW 264.7 (368).

Um estudo focou-se em determinar os alvos farmacológicos moleculares que estão subjacentes à atividade anti-inflamatória de *Harpagophytum procumbens* (369). Para tal recorreram a um extrato padronizado da planta, através do qual investigaram os seus efeitos nas várias vias moleculares intracelulares, que se sabe agora serem a base da cascata inflamatória (369). Foram então investigados os efeitos do extrato de *Harpagophytum procumbens* na libertação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e PGE<sub>2</sub>, em monócitos humanos estimulados por LPSs (369). Todos os parâmetros referidos foram inibidos, dependendo da dose (369). O efeito máximo obteve-se quando se administrou 500 mg/mL de extrato (369). Também foi demonstrado que, para doses mais baixas, a ligação de AP-1 ao DNA foi aumentada, porém, em doses mais elevadas (100-200 mg/mL), a atividade de ligação desse fator ao DNA foi claramente inibida (369). Assim sendo, este estudo indica que o extrato padronizado desta planta afeta a síntese e a libertação de fatores pró-inflamatórios, ao interferir com as vias de transdução de sinalização intracelular, como é o caso do fator de transcrição AP-1 (369). A AP-1 desempenha um papel importante na regulação da transcrição de enzimas, citocinas e moléculas de adesão, associadas às doenças inflamatórias crónicas (370).

Foi também verificado, através de testes *in vitro* que, tanto o harpagósido como o harpagido são capazes de inibir o NO induzido por LPSs, bem como a expressão da

COX-2 e da 5-LOX, impedindo, portanto, a inflamação (359). Inibidores das enzimas COX-2 e 5-LOX, em simultâneo, são vistos como regimes eficazes e promissores, para controlar os processos moleculares da inflamação e causar efeitos adversos ínfimos, comparativamente aos AINEs (359).

#### 2.1.6.2.2- Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, também conhecidos por polifenóis, são metabolitos secundários derivados de plantas, com uma ampla distribuição na natureza (371)(372). A estrutura dos polifenóis caracteriza-se pela presença de grupos hidroxilo (-OH) ligados a dois ou mais anéis aromáticos (372).

Os polifenóis são micronutrientes que estão presentes de forma abundante na nossa dieta, e que fazem parte da composição de frutas, vegetais, legumes secos e bebidas, como chá, café ou vinho (373). Estas substâncias, embora presentes em todos os alimentos vegetais, apresentam uma grande variabilidade no que respeita ao tipo e aos níveis, em função da planta, fatores genéticos e condições ambientais (371).

Os polifenóis podem ser classificados em simples fenóis, ácidos fenólicos flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e taninos (371).

Os flavonoides são um grupo que abrange compostos de baixo peso molecular: as flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-óis, antocianidinas e isoflavonas (374). A sua estrutura consiste em dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que, apesar da multiplicidade de funções e estruturas, todos eles derivam da via geral dos fenilpropanoides (375).

Os ácidos fenólicos são um grupo que inclui derivados do ácido benzoico, assim como derivados do ácido cinâmico (374).

Os taninos são produtos naturais encontrados na maioria das plantas superiores, produzidos em quase todas as partes da planta (sementes, raízes, cascas, madeira e folhas), devido ao seu papel fundamental na defesa da planta contra insetos, infeções alimentares, fungos ou bactérias (376). O mecanismo de defesa baseia-se na capacidade dos taninos em complexar proteínas de forma irreversível (376).

As propriedades antioxidantes características dos polifenóis devem-se à capacidade os mesmos em neutralizar os radicais livres, tornando-os menos perigosos e, deste modo, evitam reações colaterais (377). Os compostos fenólicos apresentam atividades farmacológicas promissoras para o tratamento de doenças inflamatórias (378). Por exemplo, a quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicromen-4-ona), a curcumina ((1*E*, 6*E*)-1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona) (CM) de *Curcuma longa*, extratos de folhas de *Baccharis dracunculifolia*, entre outros (378). Estes são ricos em compostos fenólicos com atividade antioxidante, reduzem os níveis de marcadores inflamatórios *in vitro* e em modelos animais de inflamação articular e/ou pacientes com AR (378).

Os rizomas de *Curcuma longa* são uma fonte rica do grupo dos polifenóis, denominados curcuminóides (379). A CM, o principal ingrediente ativo da curcuma, é um potente agente anti-inflamatório (379). Uma meta-análise concluiu que os extratos padronizados de curcuma aliviaram a dor nas articulações e os sintomas relacionados à inflamação, associados à artrite (379).

As raízes do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) são constituídas por compostos polifenólicos, o 6-gingerol, o 6-chogaol e os seus derivados, dotados de uma ampla atividade antioxidante (380). Gingeróis e choagóis, cetonas fenólicas, possuem uma ampla gama de efeitos farmacológicos e fisiológicos, incluindo efeitos CVs, GIs, antioxidantes, anti-inflamatórios, entre outros (380).

O 6-gingerol, o seu principal constituinte bioativo fenólico, é um líquido oleoso e o representante mais prevalente dos gingeróis no rizoma do gengibre fresco (381). Este tem recebido uma grande atenção como potencial agente terapêutico, não só pela sua eficácia através da regulação de múltiplas vias moleculares, mas também pela sua segurança (381).

Os curcuminóides e os gingeróis derivam de intermediários na via do fenilpropanoide, que são condensados com outras moléculas, derivadas, por sua vez, das vias do acetato e dos ácidos gordos de cadeia curta e média (382).

Preparações diversas de extratos diferentes (por exemplo, água, etanol e propanolol) de *Urtica dioica* L. apresentaram sucesso clínico, o que dificulta identificar o composto químico ativo geral (293). Todavia, acredita-se que os efeitos

farmacológicos observados para as partes aéreas de *Urtica dioica* sejam devidos ao conteúdo de flavonoides glicosídeos e de ácidos fenólicos (383).

#### 2.1.6.2.2.1- *Curcuma longa* L.

*Curcuma longa*, também conhecida como curcuma, pertence à família *Zingiberaceae*, é nativa do sul da Ásia e, desde há muito tempo que é utilizada em todo o mundo, não só na indústria alimentar, como também nas indústrias cosmética, medicamentosa e tinturas (384)(385). Há quase meio século que surgiram, pela primeira vez, evidências científicas de pesquisas que forneceram provas dos efeitos antiartrítico e anti-inflamatório de *Curcuma longa* (386). A partir daí, mais de mil estudos foram apresentados, descrevendo os efeitos anti-inflamatórios da curcuma e/ou do seu princípio ativo (386). Revisões recentes concluíram, de forma unanime, que as evidências da pesquisa apoiam os efeitos sistêmicos anti-inflamatórios e antiartríticos (386).

Os rizomas de *Curcuma longa* são utilizados com o intuito de obter um pó amarelo-alaranjado, o açafrão, normalmente usado como especiaria no caril e noutras cozinhas do sudeste asiático (385)(387). Para isso, os rizomas são fervidos por várias horas e, seguidamente, secos em fornos quentes, para depois serem, então, moídos (385). O seu uso tem-se mantido ao longo dos tempos devido às suas propriedades aromatizantes e digestivas (387).

Apesar de ser utilizado como um tempero alimentar, o açafrão foi empregue, desde há muitos anos, como medicamento tradicional na Índia (388). *Curcuma longa* é uma planta medicinal cujo rizoma inclui duas classes principais de metabolitos secundários, os curcuminóides fenólicos e os óleos essenciais hidrofóbicos (389). Existe referência de que os seus principais compostos ativos incluem 4–6% de curcuminóides, 2–4% de óleos essenciais e 2–3% de óleos fixos (390).

Os óleos essenciais de açafrão são, muitas das vezes, desperdiçados, quando se concedem suplementos dietéticos à base do mesmo (389). O que é certo é que, apesar de menos estudados, estes óleos essenciais apresentam inúmeras propriedades biológicas,

inclusive, propriedades antifúngicas, mosquicidas, antiveneno, antibacterianas e antioxidantes (389).

Os curcuminóides são o principal pigmento e dizem-se os compostos bioativos da curcuma (390)(303)(384). Estes incluem a CM [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] e os seus derivados, desmetoxicurcumina (DEM, do inglês demethoxycurcumin) e bisdesmetoxicurcumina (BIS, do inglês bisdemethoxycurcumin), os quais são responsáveis pela cor amarela característica da curcuma (390)(303)(384).

A CM é um polifenol hidrofóbico, dotada de um sabor terroso, amargo e apimentado, que possui várias atividades farmacológicas contra diversas patologias crónicas, como é o caso do cancro, Diabetes Tipo II (DT2), esclerose múltipla, doença de Alzheimer e aterosclerose, mas também apresenta efeitos terapêuticos contra a artrite, e várias doenças pulmonares, hematológicas e CVs (303)(385)(391).

Os extratos das raízes, em diversos modelos de cultura de células e estudos em animais, apresentaram potenciais atividades anti-inflamatória, antioxidante, quimiopreventiva e quimioterápica (392).

Os curcuminóides interatuam com vários alvos moleculares que fazem parte do processo inflamatório, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, NF- $\kappa$ B e a COX-2 (391). A CM é componente ativo mais relevante e que demonstrou possuir propriedades anti-inflamatórias e antiartríticas (393).

Há trabalhos que sugeriram que os curcuminóides são potentes agentes anti-inflamatórios que atuam por meio de múltiplos mecanismos, incluindo supressão da ativação do NF- $\kappa$ B, inibição da COX, regulação negativa da expressão da proliferação celular, produtos génicos anti-apoptóticos e metastáticos (394). Além disso, também demonstraram modular a proliferação e a resposta celular de vários tipos de células imunes, como células T, células B, macrófagos, neutrófilos, células NK e DCs (394).

Foi demonstrado que a CM medeia a supressão da via de proteínas cinases ativadas por mitogénio (MAPKs, do inglês Mitogen Activated Protein Kinases)/RANK e a via de sinalização cinases 1 e 2 reguladas pelo sinal extracelular (ERK1/2, do inglês extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) e, portanto, promove a diferenciação condrogénica (393). Além do mais, a CM inibe a diferenciação e função dos OCs, através da inibição do inibidor da cinase associada ao sinalossoma de  $\kappa$ B de uma

maneira dependente da dose (393). Assim sendo, este estudo teve como objetivo investigar o efeito da CM na osteoclastogênese de PBMCs de pacientes com AR, por meio da supressão das vias de sinalização MAPK/RANK/c-Fos/fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático 1 (NFATc1, do inglês Nuclear Factor of Activated T cells, cytoplasmic 1) (393). Os autores concluíram que a CM pode inibir o potencial osteoclastogênico de PBMCs de pacientes com AR, através da supressão das vias de sinalização da MAPK/RANK /c-Fos/NFATc1 (393). A CM inibiu o número de OCs produzidos a partir de PBMCs, de maneira dependente da dose, assim como reduziu os níveis de expressão do mRNA e da proteína RANK em PBMCs de pacientes com AR (393). Portanto, este estudo sugere que a CM pode ser um novo agente terapêutico potencial para o manuseamento da osteoporose ou deterioração óssea em doenças inflamatórias, incluindo a AR (393).

O estudo conduzido por Anna et al. teve por objetivo analisar as alterações inflamatórias, macroscópicas e radiológicas, nas articulações de animais com CIA, na presença ou não, do extrato de *Curcuma longa* (385). No grupo “controle normal” o score artrítico (AS, do inglês Arthritic Score) foi zero, muito provavelmente, por não ter sido imunizado com a emulsão de colagénio (385). Para o grupo “controle negativo” verificou-se um aumento do AS ao longo do estudo, uma vez que o mesmo foi tratado com um veículo (azeite) (385). Assim sendo, sofreu sintomas artríticos progressivos pois não havia ação anti-inflamatória que conseguisse prevenir ou retardar o processo inflamatório (385). No final do estudo, verificou-se que as articulações estavam inflamadas e com eritema (385). Quanto ao grupo “controle positivo”, este recebeu betametasona tendo apresentado modificações que provam um efeito anti-inflamatório (385). Inicialmente observou-se um aumento do AS, mas após o dia 17 houve uma diminuição, perpetuando até ao dia 28, dia no qual o AS foi zero (385). No que respeita aos grupos tratados com *Curcuma longa*, estes apresentaram um padrão de AS em função da dose, ou seja, a maior dose de *Curcuma longa*, 110 mg/kg, exibiu uma redução mais considerável do AS, seguido pelos grupos de 60 mg/kg e 30 mg/kg (385). Esta diminuição permite afirmar que o suplemento de *Curcuma longa* reduziu, com sucesso, a inflamação e o eritema articulares do tornozelo dos ratos com CIA (385).

Foi também feita uma investigação cujo objetivo era desenvolver uma formulação de um creme tópico de diclofenac de sódio em associação com um anti-inflamatório natural, a *Curcuma longa* (395). Com o mesmo pretendia-se que houvesse uma

administração mais adequada, numa área específica da pele, e que o mesmo pudesse ser utilizado no tratamento da AR sem provocar quaisquer efeitos colaterais (395). De acordo com os autores, esta associação é considerada uma boa opção, uma vez que ocorrerá um efeito sinérgico anti-inflamatório do diclofenac de sódio com a curcuma (395). Para avaliar a eficácia da formulação foram realizados diversos testes, de entre os quais, os testes de difusão *in vitro* e de irritação da pele (395). No teste de difusão *in vitro*, verificou-se que a formulação libertava 84,19% do fármaco num período de 24 horas (395). Com este estudo concluiu-se que a formulação controla a libertação do fármaco por mais tempo, o que poderá contribuir para evitar flutuações ao longo do tempo, bem como reduzir o custo da terapia (395). No caso do teste de irritação da pele, após 7 dias da aplicação do creme, não se verificou a presença de sinais de eritema nem edema (395). Os resultados obtidos, de todos os testes realizados, foram encorajadores, além de que a formulação resultante da associação de diclofenac de sódio (1%) com *Curcuma longa* foi considerada melhor, comparativamente à formulação isolada em creme de diclofenac de sódio (395).

Apesar da CM se mostrar como um potencial alvo terapêutico, o seu uso tem sido limitado devido à sua fraca absorção intestinal, metabolismo rápido e biodisponibilidade sistémica limitada (391). Para contornar essa situação foram propostas diversas estratégias, como a utilização de nanopartículas, lipossomas, dispersões sólidas, entre outras (391). O estudo piloto projetado por Almara et al. tinha como objetivo determinar a eficácia e a segurança da administração oral de duas doses diferentes da “nova” CM, altamente biodisponível, em uma formulação de matriz de curcuma, comparativamente ao placebo, em pacientes com AR ativa (391). Neste caso, para superar as limitações e melhorar a sua eficácia para a AR, bem como para outras condições inflamatórias, foi feita uma associação de curcuminóides com a matriz natural do açafraão, o que se traduziu num produto com uma ampla biodisponibilidade (391). Eram trinta e seis pacientes, dos quais cada 12 receberam: 250 mg (identificado como CM em dose baixa) e 500 mg (CM em dose alta) do produto em estudo, e o placebo (500 mg de amido de grau alimentício), por um período de 3 meses, como uma cápsula. duas vezes ao dia, 30 min após as refeições (391). A avaliação da eficácia baseou-se na resposta do ACR, VAS, parâmetros laboratoriais (PCR, ESR e FR) e o DAS28 (391). Em ambos os grupos de tratamento (doses baixa e alta de CM) verificou-se uma melhoria significativa da doença, assim como o preenchimento dos critérios de melhoria do ACR (391). Por

sua vez, nenhum paciente pertencente ao grupo do placebo alcançou esses critérios (391). Em conjunto com as variáveis incluídas nos critérios de melhoria do ACR, foi também avaliada a rigidez matinal que diminuiu, claramente, durante a administração da CM (391). Relativamente aos níveis da ESR, PCR e FR, para os grupos de tratamento, averiguou-se reduções marcantes ( $P < 0,001$ ), comparativamente à linha de base (391). Todavia, enquanto que a redução da PCR foi dependente da dose, para os outros 2 parâmetros os resultados foram semelhantes para ambas as doses (391). Logo a partir do primeiro mês de tratamento observaram-se efeitos benéficos, portanto, estes resultados apontam para a “nova” CM como um produto eficaz e seguro, com capacidade analgésica e anti-inflamatória, que foi eficiente no domínio da dor associada à AR (391).

O estudo levado a cabo por Zheng et al. tinha 2 objetivos principais (303). Primeiramente, avaliar o efeito terapêutico da CM na AR, administrada por uma injeção IV, e em segundo lugar formular o medicamento em nanoemulsões óleo-água, com a finalidade de superar a baixa biodisponibilidade oral, de modo a tornar possível a administração oral do medicamento (303). O efeito da CM na AA em ratos, foi avaliado em termos de edema da pata, índices de peso do timo e baço, e alterações patológicas na expressão do NF- $\kappa$ B e citocinas inflamatórias (303). O MTX foi utilizado como controle positivo (303). O NF- $\kappa$ B regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, bem como a diferenciação de OCs na AR, sendo por isso avaliado por análise imunohistoquímica no tecido sinovial (303). Quanto às citocinas, nomeadamente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , estas estão implicadas na regulação de uma série de processos inflamatórios envolvidos na patogénese da AR, tendo sido avaliadas no líquido sinovial e soro sanguíneo (303). Com este estudo concluiu-se que a CM, administrada por via IV, exerceu um efeito terapêutico semelhante ao MTX, na AR, uma vez que diminuiu a expressão de NF- $\kappa$ B e inibiu a libertação de mediadores inflamatórios, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (303).

#### 2.1.6.2.2.2- *Zingiber officinale* Roscoe

*Zingiber officinale* Roscoe, habitualmente conhecido por gengibre, pertence à família *Zingiberaceae*, e é comumente utilizado na culinária, como uma especiaria, e para fins medicinais, em razão do seu alto conteúdo de antioxidantes e propriedades anti-inflamatórias (396)(397)(398). O gengibre tem sido constantemente utilizado na medicina tradicional indiana e chinesa, nos últimos 25 séculos (396)(397). Este é dotado de atividades farmacológicas como propriedades antidiabéticas (DMT2), antioxidantes, gastroprotetoras, anti-inflamatórias, imunomoduladoras (em doenças alérgicas) e antiartríticas (399).

Os principais constituintes encontrados no gengibre são os gingeróis, como o 6-gingerol, 8-gingerol, o zingerone e o 6-chogaol (400). Os gingeróis e o chogaóis, em particular, exibem benefícios terapêuticos em patologias ósseas, inibindo a inflamação artrítica e respostas autoimunes (399). Os gingeróis são termicamente instáveis, portanto, a temperaturas elevadas, são convertidos no [6]-, [8]- e [10]-chogaol(401).

As propriedades do sabor, características do gengibre, resultam da combinação da pungência da oleoresina e do seu óleo essencial aromático (401). Os principais compostos pungentes do gengibre fresco são os gingeróis, uma variedade de cetonas fenólicas idênticas (401). Apesar de frequentemente consumido para fins culinários, há quem utilize o gengibre em pó para aliviar a dor inflamatória e o inchaço crônico da OA ou da AR (402).

O mecanismo de ação anti-inflamatório do gengibre foi primeiramente provado como sendo devido à inibição da síntese de PGs, através da inibição da COX-1 e da COX-2, e da biossíntese de leucotrienos por meio da inibição da 5-LOX, tendo sido estendido para a inibição da expressão das várias citocinas inflamatórias (403)(402). Este último efeito indica que o gengibre tem capacidade para modular as vias fisiopatológicas ativadas na inflamação crônica (402).

O estudo realizado por Mutthuraj et al. tinha, entre outros, o objetivo de verificar o efeito dos óleos essenciais do gengibre como agente anti-inflamatório, através do ensaio anti-inflamatório atividade estabilizadora da membrana (397). Para isso, calcularam a dosagem de extrato de óleo essencial de gengibre e administraram a 5 voluntários com artrite, por um período contínuo de 30 dias (397). A cada 10 dias

coletaram-lhes sangue, após aplicação diária do óleo de gengibre (397). Verificou-se que os níveis de FR e PCR, nos voluntários, diminuíram após a segunda administração do óleo de gengibre, e que houve redução da ESR, FR e PCR após 10 dias de aplicação do óleo essencial de gengibre, diariamente (397). Além disso, pôde observar-se uma diminuição gradual das moléculas pró-inflamatórias (397). Portanto, este estudo mostrou que o gengibre pode ser utilizado como um medicamento alternativo no tratamento da dor e edema nas articulações (397).

Foram também investigados os efeitos terapêuticos do extrato de gengibre na AR, em ratos com CIA e nos RASFs, focando a regulação das citocinas Th1, Th2 e Th17 e a inibição da liberação de MMPs (399). O extrato de gengibre (a 100 e 200 mg/kg) ou o Mobic (Meloxam) (50 mg/kg), utilizado como medicamento de referência, foram administrados por via oral a ratos CIA, uma vez por dia, durante 14 dias, após a indução da artrite (399). Os fibroblastos primários foram isolados dos tecidos sinoviais de pacientes com AO, estimulados com IL-1 $\beta$ , e tratados com extrato de gengibre em diferentes concentrações (399). A citocina do tipo Th1, como o IFN- $\gamma$ , para além de outras funções, perpetua as repostas autoimunes (399). Quanto à citocina do tipo Th2, como a IL-4, esta é um regulador positivo da artrite inflamatória (399). As células Th17 são consideradas um subconjunto de células Th, associadas ao paradigma Th1/Th2, e são responsáveis pela liberação de IL-17, que tem um papel crítico na sinovite, na patogénese de muitas doenças inflamatórias e autoimunes, inclusive a AR (399). As MMPs desempenham um papel fundamental na degradação da matriz da cartilagem na AR, sendo a sua ativação mediada por citocinas pró-inflamatórias (399). Com este estudo, o extrato de gengibre reduziu claramente os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-4 no soro de ratos e nos FLSs estimulados pela IL-1 $\beta$  (399). Isto significa que o extrato de gengibre pode prevenir danos teciduais resultantes de respostas pró-inflamatórias excessivas na AR, pela regulação de citocinas Th1/Th2 (399). Por outro lado, este extrato demonstrou diminuir o nível de IL-17 quer no soro de ratos com CIA, quer nos tecidos do baço e da pata, além de inibir, também, a produção induzida por IL-1 $\beta$  em SFs humanos (399). Tal permitiu concluir que o extrato pode prevenir a inflamação das articulações, em parte, bloqueando a produção de IL-17 (399). Além disso, também inibiu a expressão da MMP-1, MMP-3 e MMP-13 em tecidos da pata de ratos com CIA e SFs humanos ativados por IL-1 $\beta$  (399). Deste modo, o extrato de gengibre protege o osso e a cartilagem da degradação induzida por MMPs na AR (399). Em suma, este estudo veio

demonstrar que o gengibre é uma fonte natural potencial para o desenvolvimento de medicamentos para AR (399).

Um ensaio clínico recente (2019), conduzido por Aryaeian et al., era integrado por setenta pacientes com AR ativa, os quais foram alocados aleatoriamente em dois grupos, que receberam 1500 mg de gengibre em pó, ou placebo, diariamente, por 12 semanas (307). Com este ensaio avaliaram a DAS e a expressão gênica de: NF- $\kappa$ B, recetor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ , do inglês Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma), FoxP3, fator de transcrição da caixa T TBX (T-bet, do inglês T-box transcription factor TBX), proteína 3 de ligação a GATA (GATA-3, do inglês GATA binding protein 3) e ROR $\gamma$ t, como fatores intermediários de imunidade e inflamação (307). A expressão dos genes *FoxP3* aumentou significativamente dentro do grupo tratado com gengibre (307). FoxP3 é o fator de transcrição nas Treg e o seu incremento provoca um aumento da função das Tregs e modulação do sistema imunológico, além de que previne DAS (307). Além disso, a expressão dos genes *T-bet* e *ROR $\gamma$ t* diminuiu significativamente entre os dois grupos (P-value <0,05) (307). T-bet é o fator de transcrição das células Th1, responsável por induzir a proliferação de células Th1, e é essencial para a produção de IFN- $\gamma$ , além de inibir, também, a diferenciação de células Th2 (307). No grupo tratado com gengibre, a expressão dos genes *PPAR- $\gamma$*  aumentou significativamente (P-value =0,047), mas a diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa (P-value =0,12) (307). A expressão de PPAR- $\gamma$  em monócitos e em macrófagos derivados de monócitos pode ser um indicador da atividade da doença e da eficácia do tratamento na AR (307). A redução na DAS foi estatisticamente significativa no grupo do gengibre e entre os dois grupos após a intervenção (307). Quanto ao NF- $\kappa$ B, a redução entre os grupos não foi significativa, porém diversos estudos mostraram o efeito do gengibre no alívio da inflamação, reduzindo a via do NF- $\kappa$ B (307). O tratamento com gengibre também não causou um aumento significativo na expressão do gene *GATA-3* (307). O fator de transcrição GATA-3 é essencial para o desenvolvimento precoce de células T e diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> naíve em células efetoras Th2, e inibição da diferenciação de células Th1 (307). Assim sendo, pode concluir-se que o gengibre tem capacidade para reduzir as manifestações da AR e melhorar a função do sistema imunológico, através da redução da expressão dos genes *NF- $\kappa$ B*, *ROR $\gamma$ t* e *T-bet*,

envolvidos na inflamação e na autoimunidade e, por outro lado, aumentando a expressão dos genes *FoxP3*, *PPAR-γ* e *GATA-3*, envolvidos na tolerância (307).

Lee et al., recorrendo ao modelo de inflamação de macrófagos estimulados por LPSs, investigaram os efeitos anti-inflamatórios do 6-gingerol (404). Os autores descobriram que o mesmo pode reduzir a enzima iNOS e a expressão do TNF- $\alpha$ , através da supressão da fosforilação da I $\kappa$ Ba, ativação nuclear do NF- $\kappa$ B e translocação da proteína cinase C alfa (PKC- $\alpha$ , do inglês Protein Kinase C- $\alpha$ ), o que, por sua vez, impede a mobilização de Ca<sup>2+</sup> e interrompe o potencial de membrana mitocondrial em macrófagos estimulados por LPSs (404). Portanto, a atividade anti-inflamatória do 6-gingerol surge do bloqueio da sinalização do NF- $\kappa$ B e da PKC- $\alpha$ , o que indica que este composto pode ser útil no tratamento de doenças inflamatórias (404).

Já em 2012, Lee et al. investigaram o alvo molecular da 1-desidro-[10]-gingerdiona (D10G, do inglês 1-dehydro-[10]-gingerdione), um dos constituintes pungentes do gengibre, que interfere na inibição da expressão de genes inflamatórios ligados ao TLR, regulada pelo NF- $\kappa$ B (402). Do estudo, concluíram, que a D10G inibiu a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  catalisada por IKK $\beta$ , uma etapa coincidente nas vias de ativação do NF- $\kappa$ B em macrófagos, mediada pelo TLR2/6, TLR4 ou TLR5, culminando na supressão da expressão de genes inflamatórios, como *iNOS*, *COX-2* ou *IL-6*, nas células, regulada pelo NF- $\kappa$ B (402). D10G apresentou efeito anti-inflamatório ao inibir a expressão dos genes inflamatórios que são regulados pelo NF- $\kappa$ B (402).

O zingerone, também conhecido por vanilacetona, teve o seu efeito anti-inflamatório comprovado, *in vitro*, por redução da PGE2, após secagem do gengibre (405). Por sua vez, foi também demonstrado, por Ruangsuriya et al., em 2016, que o zingerone inibiu eficientemente a expressão dos níveis de RNAm do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, e apresentou tendência em reduzir os níveis de fosforilação da quinase N-terminal p38 e c-Jun (405). Com isto, pôde-se afirmar que o zingerone diminuiu potencialmente a degradação da cartilagem (405).

#### 2.1.6.2.2.3- *Urtica dioica* L.

*Urtica dioica* L., também conhecida como urtiga, pertence à família *Urticaceae* e encontra-se distribuída ao longo de todo o mundo, nas regiões temperadas e tropicais (406)(407)(408). A mesma é bastante conhecida pela sua atividade biológica e benefício na saúde humana (408). Desde há muito tempo que a urtiga fresca era utilizada para urticção, isto é, para “agitar” membros artríticos ou paralisados, ao estimular a circulação e aquecer as articulações e extremidades (408).

Uma ampla gama de estudos clínicos demonstrou a eficácia do tratamento externo com folhas de urtiga, na dor articular, e o seu uso interno, na artrite (409). A urtiga é regularmente utilizada em DRs pelas suas atividades anti-inflamatória e imunossupressora (294).

A denominação “urtiga” vem do latim “uro”, que significa queimadura, sensação causada pela planta (407). Quando tocada, esta planta injeta vários produtos químicos, inclusive acetilcolina, histamina, serotonina, moroidina, leucotrienos e, possivelmente, ácido fórmico, causando uma picada dolorosa ou parestesia, razão pela qual o seu nome comum é urtiga (410).

Alguns cientistas estudaram a composição química desta planta e demonstraram que as suas folhas continham uma grande variedade de constituintes químicos, como minerais, vitaminas, aas, flavonoides, esteróis, compostos fenólicos e ácidos gordos, que têm efeitos benéficos na saúde humana, para além da clorofila, caroteno e xantofila (411)(410). A raiz, por sua vez, é dotada de taninos, cumarina, triterpenos, linhanos, esteróis e flavonoides (410). Quanto aos polissacáridos e aos ácidos maleico e cafeico, até certo ponto, estão presentes em todas as partes da planta (410).

Os componentes medicinais desta planta têm utilidade, não só em produtos farmacêuticos, como em cosméticos e a nível alimentar (407). Vários estudos sugerem que extratos desta planta apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anti-ulcerativas e analgésicas, entre muitas outras atividades biológicas (408)(407). Várias preparações de extratos diferentes (por exemplo, água, etanol e propanolol) apresentaram sucesso clínico, o que dificulta identificar o composto químico ativo geral e comparar a eficácia dos estudos clínicos (293). Comumente,

recorre-se aos extratos de urtiga solúveis em água ou etanol para avaliar os seus efeitos anti-inflamatórios (293).

Porém, acredita-se que os efeitos farmacológicos observados para as partes aéreas de *Urtica dioica* sejam devidos ao conteúdo de flavonoides glicosídeos, como a quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina) e quercetina-3-*O*-glicosídeo (isoquercitrina), kaempferol-3-*O*-rutinosídeo e isorhamnetina-3-*O*-glucósido, e ao de ácidos fenólicos, como o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (ácido clorogénico) e o ácido 2-*O*-cafeoilmálico (383).

Um estudo clínico demonstrou que a administração de *Urtica* a um indivíduo saudável não teve efeito sobre a expressão dos genes de citocinas, como TNF, IL-1, IL-4, IL-6 e IL-10 (294). Todavia, a mesma foi capaz de atenuar a expressão dessas citocinas após imunestimulação, o que, provavelmente, resulta da sua capacidade em inibir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (294). Shakibaei et al., em 2011, fizeram um estudo cuja finalidade era caracterizar os efeitos e o mecanismo de ação de três extratos botânicos, de plantas com atividade anti-inflamatória previamente relatada, na expressão do NF- $\kappa$ B em condrócitos articulares caninos: rosa mosqueta (*Rosa canina*), casca de salgueiro (*Salix alba*) e folha de urtiga (*Urtica dioica*) (308). Os resultados obtidos sugeriram fortemente que os extratos botânicos inibem a suprarregulação induzida por IL-1 $\beta$  das MMP-9, MMP-13 e COX-2, prevenindo, pelo menos em parte, a degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  e a ativação do NF- $\kappa$ B (308).

Está clinicamente comprovado que *Urtica dioica* é eficaz no tratamento da artrite, e que tal se deve à sua forte ação anti-inflamatória (412)(413). Esta é resultado da estabilização do complexo NF- $\kappa$ B, além de que, está também associada à inibição da fosfolipase A2 $\alpha$  citosólica (cPLA2 $\alpha$ , do inglês cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ ), à capacidade de inibir várias citocinas pró-inflamatórias, além de possuir, também, propriedades antioxidantes (412)(413).

As fosfolipases A2 (PLA2, do inglês phospholipase A2) têm um papel crucial na resposta inflamatória (414). A sua ação culmina na libertação de lisofosfolípido e de ácido araquidónico (414). Este último é o precursor da síntese dos eicosanoides (como, PGs e leucotrienos), que são mediadores lipídicos da resposta inflamatória (414).

Um estudo verificou que os extratos de raízes, onde predominam os linhanos, eram melhores na inibição da produção de tromboxano, enquanto que os extratos da parte aérea, onde se encontram os ácidos fenólicos e os flavonoides glicosídicos foram

mais específicos na inibição da 12-lipoxigenase (12-LOX) (415). Além do mais, o extrato da raiz também atenuou a secreção de quimiocinas pró-inflamatórias e a expressão de COX-2 estimulada por LPSs (415).

Foi elaborado um estudo por Liao et al. cujo objetivo era desenvolver e caracterizar um gel, partindo do extrato de metanol das raízes de *Urtica dioica* com Carbopol 934, para tratamento da artrite em ratos (416). O gel então preparado, foi submetido a vários testes físicos e avaliação *in vivo*, da qual fazem parte testes analgésicos e anti-inflamatórios, em ratos com AA, e foi comparado com um gel de indometacina (2%) utilizado como padrão (416). O gel exibiu propriedades anti-inflamatórias e analgésicas excelentes, comparáveis às do gel padrão (416). Demonstrou 55.05% de inibição do edema da pata, em um modelo de edema da pata traseira de rato induzido por carragenina, comparativamente ao gel padrão (53.93%), após 24h (416). Além disso, apresentou 58.21% de analgesia em comparação com 61.19% do gel de indometacina padrão, no teste de contorção (416). Assim sendo, o gel tópico de *Urtica dioica* pode ser uma alternativa eficaz e segura em relação aos AINEs, apresentando potencial para ser utilizado no tratamento da AR (416).

Extratos de folhas de *Urtica dioica* demonstraram atividade antagonista do recetor de histamina-1, assim como redução da formação de PGs, através da inibição de enzimas centrais nas vias pró-inflamatórias, como a COX-1, COX-2 e a PGD2 sintetase hematopoiética (417). Por outro lado, uma fração de polissacáridos, isolada de um extrato aquoso da urtiga que continha 4 polissacáridos distintos, exibiu atividade inibitória no modelo de edema da pata de rato induzido por carragenina (417)(418). Cinco horas após administração oral da urtiga verificaram que a atividade inflamatória foi idêntica à exercida pela indometacina (418). Essa atividade deveu-se à inibição da produção da COX, LOX e citocina (418).

#### 2.1.6.2.3- Outros

A partir do pó de *Rosa canina* isolaram um galactolípido presente em grande quantidade, denominado GLGPG (do inglês, galactolipid (2*S*)-1,2-di-*O*-[(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadeca-9,12,15-trienoyl]-3-*O*-beta-D-galactopyranosyl glycerol) abreviado como GOPO, o qual apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (419). Além de

que, demonstrou ser condroprotetor e regenerativo quando testado em condrócitos humanos (419). O mesmo pó padronizado de *Rosa canina* também demonstrou ser eficaz na redução da inflamação da artrite e da dor associada, bem como na diminuição dos marcadores inflamatórios (420).

#### 2.1.6.2.3.1- *Rosa canina* L.

A rosa mosqueta (*Rosa canina*), pertencente à família *Rosaceae* é também conhecida por rosa canina, fruta do quadril, árvore do quadril, entre outros (421). Os frutos da rosa mosqueta são conhecidos pela sua grande quantidade de compostos fenólicos, que lhe atribui uma grande capacidade antioxidante, e por serem uma fonte valiosa de vitamina C (422). Os frutos de *Rosa canina* são constituídos por vários componentes bioativos: açúcares, ácidos orgânicos, pectinas, flavonoides (quercetina, ácido elágico, quercetina-glicosídeos, ácidos hidroxicinâmicos, agliconas de proantocianidina) taninos, carotenoides ( $\beta$ -caroteno, licopeno, rubixantina, gazaniaxantina,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina), ácidos gordos, vitaminas (particularmente vitamina C e, também, vitaminas B1, B2, K, PP, E), macro- e microelementos, entre outros (423)(421).

O uso de *Rosa canina* como remédio medicinal remonta à época de Hipócrates, tendo atingido o seu pico no decurso da Segunda Guerra Mundial (424). Nesta última, o xarope, de elevado teor em vitamina C, foi introduzido na dieta, por forma a suprimir a carência de frutas cítricas frescas e, mais tarde, para prevenir o escorbuto (424).

Os frutos de *Rosa canina* têm tido destaque, não só como medicamento, mas também por serem uma fonte de alimento, para diversas culturas (423). Os preparados alimentares que recorrem a esta planta abrangem o sumo, vinho, chá, geleia, entre outros (423). Em resultado da sua elevada composição de ácidos gordos insaturados e antioxidantes, o óleo de *Rosa canina* tem uma proteção relativamente alta contra a inflamação e o stresse oxidativo (425).

Os ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolénico demonstraram, *in vitro*, reduzir a atividade das COX-1 e COX-2 (426). Além disso, existe um composto em particular, o GOPO, isolado do pó de rosa mosqueta que, provou *in vitro*, apresentar propriedades anti-

inflamatórias, uma vez que inibiu a quimiotaxia de neutrófilos (426)(427)(428). Por outro lado, ainda na tentativa de isolar os princípios ativos do pó de rosa mosqueta, alguns autores isolaram três ácidos triterpênicos (ácido oleanólico, ácido ursólico e ácido botulínico) com atividade inibitória da COX e LOX (429). O objetivo do estudo foi caracterizar os princípios do pó de *Rosa canina*, que podem modular a liberação de IL-6 de células Mono Mac 6 ativadas por LPSs (429). A linha de células Mono Mac 6 assemelha-se a monócitos humanos maduros (macrófagos) e produz IL-6 de uma maneira dependente da dose, após ativação com LPSs (429). Ao isolarem a mistura daqueles ácidos e ao compararem a sua atividade inibitória e das três combinações possíveis entre os mesmos, verificaram que a combinação de ácido oleanólico ou ácido ursólico com ácido botulínico pode aumentar a atividade imunomoduladora dos dois ácidos triterpênicos (429). Os três ácidos identificados neste estudo, em várias linhas celulares, mostraram atividade inibitória do NF- $\kappa$ B (429). Portanto, acredita-se que a atividade imunomoduladora da mistura de ácidos triterpênicos possa ser esclarecida pela inibição indireta da expressão gênica da IL-6 mediada pelo NF- $\kappa$ B em células Mono Mac 6 ativadas por LPSs, isto é, pela prevenção da fosforilação e degradação de I $\kappa$ B e da interação com os GRs (429).

O pó de rosa mosqueta também foi capaz de reduzir a ESR e melhorar a qualidade de vida em pacientes com AR, o que indica que o mesmo pode ser utilizado como um suplemento, além do tratamento padrão da AR (430).

### **Capítulo 3- O papel do Farmacêutico na artrite reumatoide**

Nas últimas décadas, o papel do farmacêutico sofreu uma grande revolução, passando este do principal responsável em distribuir um produto medicamentoso ao doente, com segurança e precisão, para um sujeito que trabalha em parceria com médicos, enfermeiros e outros profissionais de saúde, em ambientes de prática sofisticados e altamente especializados para garantir o gerenciamento adequado da terapia medicamentosa (431).

O uso impróprio de medicamentos por parte do doente é uma das principais razões para readmissões hospitalares, e veio realçar a importância do atendimento farmacêutico integrativo, que otimiza a conformidade e diminui os eventos adversos

medicamentosos (431). A não adesão à terapêutica em DRs inflamatórias crônicas é frequente e está associada a piores resultados, e custos relevantes (432).

Apesar da evolução do papel do farmacêutico na prestação de cuidados de saúde, numa variedade de ambientes de prática, o farmacêutico comunitário tem mais possibilidades em causar um impacto significativo nas populações com as quais contacta (431). O farmacêutico é um dos profissionais de saúde mais acessíveis e o seu papel tem progredido a fim de fornecer uma variedade de serviços para a saúde, tanto individual, como da comunidade (431).

A AR, quando não controlada, pode resultar em dano articular, incapacidade grave, diminuição da qualidade de vida, início de comorbidades e mortalidade prematura (433). As comorbidades incluem, entre outras, a doença CV, cancro, infeções, depressão e doença GI (433). Assim sendo, na possibilidade da obtenção de um controlo mais rápido, as complicações e comorbidades referidas poderiam ser evitadas (433).

De acordo com o ACR, o tratamento da AR destina-se ao alívio da dor e desconforto e à melhoria dos sintomas; suspender ou limitar a progressão da doença e, se possível, reverter as alterações patológicas; preservar a mobilidade e a função; e promover uma melhor qualidade de vida, na medida do possível, onde a posição do farmacêutico é considerada importante (434).

Ainda que o tratamento farmacológico possa ser essencial no controlo das crises agudas e da dor episódica associada à doença, não se pode descartar o papel do autocuidado e da gestão domiciliária da AR, que são importantes para uma gestão eficaz da mesma (435). Existem evidências de que o autocuidado reduz efetivamente as crises agudas, podendo este ser obtido através da educação e aconselhamento do paciente (435). Os farmacêuticos dispõem de uma prática, o Acompanhamento Farmacoterapêutico, que integra essas áreas de cuidado (435).

O Acompanhamento Farmacoterapêutico consiste num serviço, prestado por farmacêuticos, centrado no doente, que abrange, não se limitando, a educação sobre a doença, gestão da terapia, autocuidado e autogestão da doença, terapia e orientação motivacional (435). Ou seja, é a “contribuição do farmacêutico para o cuidado dos indivíduos, a fim de otimizar o uso de medicamentos e melhorar os resultados em saúde” (436).

Evidências indicaram que a consulta, educação e aconselhamento sobre doenças, orientados por farmacêuticos, bem como a intervenção telefônica, melhoraram o autocuidado dos pacientes (435). Várias doenças crônicas estão a ser monitoradas com o apoio do farmacêutico, que auxilia na otimização da gestão da medicação (433). A educação dos pacientes acerca da gestão da AR fá-los-á compreender os sinais e sintomas da mesma, e a criar formas de diminuir ou limitar os fatores agravantes (435).

Tendo em conta a prevalência da AR e o aumento da complexidade do seu tratamento, surge uma maior procura por recursos de saúde, o que se traduz num aumento do tempo de espera por uma consulta com um reumatologista (437). Em consequência disso, algumas clínicas integram profissionais de saúde para auxiliar nas atividades adequadas da gestão de doenças e medicamentos (437).

Sabe-se que o envolvimento do enfermeiro na gestão da AR tem um efeito positivo, todavia, em relação a outro profissional de saúde, o seu envolvimento permanece em grande parte, não investigado (437). Existem poucos dados acerca do papel do farmacêutico neste contexto (437).

O estudo guiado por Hall et al. teve como finalidade comparar a satisfação do paciente entre dois modelos, o modelo de assistência colaborativa médico-farmacêutico e o modelo de assistência tradicional, fornecida pelo médico (437). Os pacientes do primeiro modelo mostraram-se consistentemente mais satisfeitos, o que sugere que o acompanhamento de doentes com artrite inflamatória por farmacêuticos que trabalham em colaboração com reumatologistas é mais do que apropriado (437). Ainda que a satisfação seja somente uma medida de um modelo de atendimento clínico, o modelo colaborativo excedeu as expectativas (437). Portanto, este estudo sustenta o papel dos farmacêuticos, para tal, recorrendo a uma abordagem de cuidado colaborativo, cuja finalidade passa pelo cuidado de pacientes em clínicas de reumatologia (437).

Foi realizado um outro estudo cujo propósito era avaliar a eficácia e a segurança do modelo de atendimento colaborativo, numa clínica de tratamento de AR (433). Foram então criados dois grupos: o grupo de tratamento padrão, que iniciou um DMARD não biológico (nb-DMARD, do inglês non biologic-DMARD) nos 12 meses antes e o grupo de tratamento colaborativo, que iniciou o nb-DMARD 24 meses depois, da implementação da clínica (433). O primeiro grupo foi tratado apenas por reumatologistas e médicos, enquanto que o segundo, por uma colaboração entre

reumatologistas e farmacêuticos (433). Na generalidade, obteve-se uma percentagem maior de doentes pertencentes ao grupo de tratamento colaborativo que atingiram a dose ótima de nb-DMARD, comparativamente ao grupo de tratamento padrão, em todos os momentos do estudo: seis meses (60,50% vs 36,80%), nove meses (63,2% vs 36,8%) e um ano (68,40% vs 39,5%) (433). Verificou-se, ainda, uma conformidade com as recomendações de segurança das diretrizes do hospital sobre o monitoramento do nb-DMARD, significativamente maior no grupo de tratamento colaborativo (70,6% vs 44,1%) (433). Além disso, detetou-se uma maior incidência de eventos adversos a medicamentos, associada aos nb-DMARDs, para o grupo de tratamento colaborativo (26,3% vs 18,4%), sendo mais comuns os eventos GIs (29,4%) (433). Por outro lado, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos para os custos de saúde, embora o custo tenha sido ligeiramente maior no grupo de tratamento colaborativo (433).

No que respeita à experiência dos doentes tratados com a colaboração de reumatologistas e farmacêuticos, no geral, obteve-se um grau elevado de satisfação (pontuação média de 4,45/5) (433). Estes pacientes referiram que “os farmacêuticos forneceram informações claras e detalhadas sobre a sua doença e medicamentos” e “estavam confiantes de que sabiam quais os efeitos colaterais possíveis” (433). Além disso, expressaram maior probabilidade em aderir ao tratamento e a maioria estava disposta a voltar (433).

O estudo elaborado por Stockl et al. tinha como finalidade avaliar a adesão à terapêutica medicamentosa injetável em doentes com AR, que participavam num programa de gestão da terapia da doença (DTM, do inglês Disease Therapy Management), comparativamente aos doentes que não participavam, e a qualidade de vida relacionada com saúde, produtividade no trabalho e funcionamento físico, antes e após completar o programa DTM para a AR (438). Uma empresa nacional de gestão de benefícios de farmácia (PBM, do inglês Pharmacy Benefits Management) implementou o programa DTM, grátis, para pacientes que recebem serviços de farmácia especializados (438). O objetivo do programa era melhorar a adesão à medicação, maximizar os resultados terapêuticos e melhorar o funcionamento físico e a qualidade de vida relacionada à saúde, habilitando os pacientes e melhorando os seus conhecimentos sobre AR (438). Cada doente recebia consultas via telefone, com um farmacêutico ou enfermeiro, durante todo o programa, associada a um serviço de

entrega de medicamentos por correio, lembretes de reabastecimento por coordenadores de atendimento, e acesso a um farmacêutico 24 horas por dia, 7 dias por semana (438). Esta consulta destinava-se a educar o paciente sobre a sua condição médica e as opções terapêuticas, e ajudou a maximizar os resultados terapêuticos, promovendo a adesão e persistência ao medicamento (438).

Do mesmo modo, um outro estudo avaliou a adesão à medicação depois de uma intervenção farmacêutica, por telefone, em pacientes idosos, na Inglaterra, que tinham uma prescrição medicamentosa recente para uma condição crónica, incluindo Acidente Vascular Cerebral (AVC), doença CV, asma, diabetes ou AR (438). Ao fim de 4 semanas de acompanhamento, os doentes que tiveram intervenção, comparativamente àqueles que não a receberam, apresentaram uma taxa significativamente menor de não adesão à terapêutica (9% *vs* 16%) e uma taxa significativamente menor de resultados negativos da medicação (DRPs, do inglês Drug-Related Problems) (23% *vs* 34%) (438).

Em suma, o farmacêutico é dotado de um papel relevante na AR, inclusive na melhoria da adesão do doente à terapêutica, na educação e no aconselhamento acerca da doença e da sua medicação (434). Segundo o conceito “Acompanhamento Farmacoterapêutico”, este profissional de saúde exerce um papel crucial na criação de relações com os pacientes, adquirindo informação do seu histórico de medicação, precavendo e resolvendo os DRPs (434).

Por exemplo, as farmácias comunitárias são a principal fonte onde os pacientes podem adquirir os AINEs e, neste sentido, cabe ao farmacêutico avaliar o doente que os pretende adquirir, avaliar os AINEs presentes nas prescrições quanto a fatores de risco, e providenciar informação sobre os mesmos (439). Intervenções em farmácias comunitárias, em relação aos AINEs, podem não só prevenir problemas graves de longo prazo, como lesão renal aguda e complicações GIs, assim como sensibilizar positivamente o conhecimento do paciente (439).

Foi também referido por Erickson et al. que os farmacêuticos podem servir como um meio de informação sobre os medicamentos, pois estes “são capazes de avaliar a literatura e resumi-la para o provedor” (440). Um farmacêutico também pode documentar informações sobre medicamentos no prontuário médico, com referências adequadas, ou contactar o paciente diretamente, para responder a uma pergunta

relacionada a medicamentos (440). Além disso, também foi sugerido que os farmacêuticos podem auxiliar na seleção da terapêutica mais adequada (440).

#### **Capítulo 4- Conclusão**

A AR é uma DA inflamatória sistêmica, dotada de uma grande complexidade, caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva, que pode traduzir-se em incapacidade grave e morte prematura. Ainda não se compreende o mecanismo exato pelo qual a AR se inicia e progride, porém quer o mecanismo inato, quer as funções imunes adaptativas, são entendidas, e aparentam trabalhar em conjunto a fim de gerar e disseminar reações inflamatórias que atingem as articulações.

Esta patologia é marcada pela destruição progressiva da cartilagem e do osso, o que normalmente se atribui a um processo inflamatório crônico, com períodos de exacerbação aguda. Histologicamente, visualiza-se hiperplasia sinovial e neovascularização, formação de pannus e, posteriormente, perda de matriz condral e óssea.

O tratamento da AR teve uma evolução notória nos últimos tempos, pelos vários fatores referidos anteriormente. Atualmente recorre-se a 5 linhas terapêuticas, cujo objetivo é controlar a progressão e os sintomas da doença: sDMARDs; bDMARDs; GCs; AINEs e analgésicos.

O recurso a GCs, analgésicos e AINEs, para tratar a inflamação, vai fazer com que enfrentemos um período em que as pessoas apresentam sintomas de abuso de analgésicos e os seus efeitos adversos, como problemas GIs, CVs, diabetes, osteoporose, glaucoma, entre outros. Além do mais, uma vez que o sistema imunológico se encontra comprometido, faz-se uso de medicamentos imunossuppressores, os DMARDs, que se encontram associados a um aumento do risco de infecções oportunistas.

Desde há muito tempo, que se recorre a plantas como tratamento alternativo para uma vasta gama de patologias, abrangendo processos inflamatórios de diferentes origens, na medicina tradicional. Estas demonstraram proporcionar um alívio sintomático equiparável ao alcançado com medicamentos alopáticos.

Compostos anti-inflamatórios derivados de plantas incluem flavonoides, terpenos, quinonas, catequinas, alcaloides, entre outros, os quais se sabe apresentarem capacidade em modular a expressão de sinais pró-inflamatórios.

É certo que muitas preparações à base de plantas são descritas como apresentando atividade contra condições imunológicas. Assim sendo, o desenvolvimento destes medicamentos padronizados, cuja eficácia e segurança estejam comprovadas, assume uma grande importância, por um lado, para aumentar o acesso a esta terapia e, por outro, para disponibilizar novas opções terapêuticas.

Na presente dissertação foram abordados alguns produtos naturais, comumente utilizados na terapia da artrite, como o *Tripterygium wilfordii* Hook F, *Boswellia serrata* Roxb.ex Colebr., *Harpagophytum procumbens* Burch.DC. ex Meisn., *Curcuma longa* L., *Zingiber officinale* Roscoe *Urtica dioica* L. e a *Rosa canina* L. Estas plantas demonstraram capacidade em controlar a inflamação característica desta doença, por múltiplas vias, além de que demonstraram, também, atividade antiartrítica.

Apresentaram capacidade em inibir citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Por exemplo, o triptólido de *Tripterygium wilfordii* Hook F demonstrou inibir a expressão dos genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-8* induzida pelo TNF- $\alpha$ , o que mostrou a sua capacidade anti-inflamatória, nos FLSs.

Quanto ao celastrol, outro composto ativo isolado de *Tripterygium wilfordii* Hook F, este demonstrou uma potente atividade antiartrítica. Não só atenuou a gravidade da AA, assim como suprimiu a resposta de citocinas pro-inflamatórias (por exemplo, *IL-17* e *IL-6*). Além disso reduziu significativamente a expressão gênica de quimiocinas específicas, recetores de quimiocinas e aqueles envolvidos na atividade de quimiocinas nos RASFs.

*Boswellia serrata* também provou ter capacidade em reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (como a *IL-6*, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , entre outros), as quais têm um papel fundamental na manutenção da inflamação crônica e no dano tecidual, durante o desenvolvimento da patologia.

A inflamação foi também controlada através da regulação do equilíbrio do Th17/Treg e modulação do cross talk-osteomune, pelo celastrol, o que oferece uma vantagem sobre compostos ou fármacos que inibam apenas as células Th17,

apresentando potencial de ser utilizado no tratamento concomitante da inflamação e do dano ósseo associados à artrite.

Além disso, também demonstraram capacidade de suprimir enzimas pró-inflamatórias, como a COX-2 e a 5-LOX, como por exemplo, a *Rosa canina*, o *Harpagophytum procumbens* e a *Boswellia serrata*.

Por outro lado, foi demonstrado que alguns dos componentes bioativos exercem o seu mecanismo de ação por intermédio do controlo que exercem sobre os mediadores moleculares de inflamação, como o NF- $\kappa$ B e o STAT3. Por exemplo, o efeito do celastrol no equilíbrio Th17/Treg nas articulações que se deveu ao facto do mesmo poder limitar, de forma indireta, a diferenciação de Th17, mas melhorar a geração de Treg, ao impedir a ativação de STAT3. Também os curcuminóides, de *Curcuma longa*, são potentes agentes anti-inflamatórios que atuam por meio de múltiplos mecanismos, como a supressão da ativação do NF- $\kappa$ B.

Já a *Urtica dioica* apresenta uma forte ação anti-inflamatória não só pela estabilização do complexo NF- $\kappa$ B como, também, pela inibição da fosfolipase A2 $\alpha$  citosólica e pela capacidade de inibir várias citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, podem modular o equilíbrio Th17/Treg controlando os níveis relativos de certos fatores de transcrição, como foi o caso do gengibre. O gengibre apresentou capacidade em reduzir as manifestações da AR e melhorar a função do sistema imunológico, através da redução da expressão dos genes *NF- $\kappa$ B*, *ROR $\gamma$ t* e *T-bet*, envolvidos na inflamação e na autoimunidade e, por outro lado, aumentando a expressão dos genes *FoxP3*, *PPAR- $\gamma$*  e *GATA-3*, envolvidos na tolerância.

Do mesmo modo, atuando por meio de algumas citocinas, como a IL-17, e outros mediadores, como o RANKL, os produtos naturais afetam tanto a resposta das células T, como o cross-talk osteoimune e a saúde óssea. O gengibre demonstrou prevenir a inflamação das articulações, em parte, bloqueando a produção de IL-17, que tem um papel crítico na sinovite, na patogénese de muitas doenças inflamatórias e autoimunes, inclusive a AR. O celastrol de *Tripterygium wilfordii* Hook F inibiu o dano ósseo induzido por inflamação, através da modulação do cross-talk osteoimune que se deve, em parte, à inibição do nível/atividade da enzima de degradação da matriz MMP-9 e do RANKL.

Os produtos naturais são vistos como uma possível fonte de novos agentes bioativos. Alguns deles demonstram igual eficácia aos fármacos tradicionais, como por exemplo, o *Tripterygium wilfordii* Hook F. Os resultados obtidos de um ensaio clínico indicaram que a monoterapia com *Tripterygium wilfordii* Hook F e a monoterapia com MTX apresentaram uma eficácia análoga, e que a terapia combinada de MTX com *Tripterygium wilfordii* Hook F apresentou maior eficácia do que a terapêutica em monoterapia com o MTX, o que demonstra que remédios à base de *Tripterygium wilfordii* Hook F conceberam melhores resultados terapêuticos do que os DMARDs isolados.

Um estudo avaliou o potencial anti-inflamatório de *Boswellia serrata* e, para tal, utilizou como fármaco padrão um AINE, a indometacina. A *Boswellia serrata* apresentou uma diminuição significativa do edema, quando na concentração mais elevada, superior à indometacina, e também se verificou uma diminuição dos infiltrados celulares maior, quando os ratos foram tratados com a concentração maior de *Boswellia serrata*, comparativamente à indometacina. Este estudo veio apoiar o uso desta planta na medicina tradicional, como medicamento anti-inflamatório à base de plantas.

Uma outra investigação avaliou a formulação de um creme tópico de diclofenac de sódio em associação com um anti-inflamatório natural, a *Curcuma longa*. Os resultados obtidos, de todos os testes realizados, foram encorajadores, sendo que a formulação resultante da associação de diclofenac de sódio (1%) com *Curcuma longa* foi considerada melhor, comparativamente à formulação isolada em creme de diclofenac de sódio.

Posto isto, os medicamentos à base de plantas representam uma possível alternativa para atenuar os sintomas em pacientes que sofram desta condição patológica, assim como, para colmatar as desvantagens associadas ao uso de fármacos alopáticos.

A não adesão à terapêutica em DRs inflamatórias crônicas é comum, e neste sentido destaca-se o papel do farmacêutico. Sendo este um dos profissionais de saúde mais acessíveis pode, não se limitando, educar sobre a doença, auxiliar na gestão da terapia, autocuidado e autogestão da doença, terapia e orientação motivacional. Este profissional tem capacidade para estabelecer relações com os pacientes, adquirindo informação do seu histórico de medicação, precavendo e resolvendo os DRPs.

Além disso, apesar de existirem poucos dados sobre o papel do farmacêutico na AR, cada vez mais se destaca a importância do atendimento farmacêutico integrativo, que otimiza a conformidade e diminui os eventos adversos medicamentosos.

## Capítulo 5- Bibliografia

1. 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.* 2010;62(9):2569–81.
2. Sociedade Portuguesa de Reumatologia [Internet]. [cited 2020 Jul 5]. Available from: <https://spreumatologia.pt/artrite-reumatoide/>
3. Marques A, Branco J da C, Costa JT da, Miranda LC, Almeida M, Reis P, et al. Programa nacional contra as doenças reumáticas [Internet]. Direcção-Geral da Saúde. Lisboa; 2005 [cited 2020 Jun 30]. p. 92. Available from: <https://www.dgs.pt/areas-em-destaque/plano-nacional-de-saude/programas-nacionais/programa-nacional-contra-as-doencas-reumaticas-pdf.aspx>
4. Alope C, Ibiam UA, Orji OU, Ugwuja EI, Ezeani NN, Aja PM, et al. Anti-arthritic potentials of ethanol and aqueous extracts of stem bark of *Cleistanthus patens* on complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *J Ayurveda Integr Med* [Internet]. 2019;S0975-9476(18):30605–3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2018.12.009>
5. Zaka M, Sehgal SA, Shafique S, Abbasi BH. Comparative in silico analyses of *Cannabis sativa*, *Prunella vulgaris* and *Withania somnifera* compounds elucidating the medicinal properties against rheumatoid arthritis. *J Mol Graph Model* [Internet]. 2017;74:296–304. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.04.013>
6. Ghoryani M, Shariati-Sarabi Z, Tavakkol-Afshari J, Ghasemi A, Poursamimi J, Mohammadi M. Amelioration of clinical symptoms of patients with refractory rheumatoid arthritis following treatment with autologous bone marrow-derived

- mesenchymal stem cells: a successful clinical trial in Iran. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;109:1834–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.056>
7. Blüml S, Smolen JS. Rheumatoid arthritis. In: *The Autoimmune Diseases*. 6th ed. 2019. p. 659–73.
  8. van Delft MAM, Huizinga TWJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* [Internet]. 2020;110:102392. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102392>
  9. Kwoh CK, Anderson LG, Greene JM, Johnson DA, O’Dell JR, Robbins ML, et al. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update - American College of Rheumatology Subcommittee on rheumatoid arthritis guidelines. *Arthritis Rheum*. 2002;46(2):328–46.
  10. Umar S, Umar K, Sarwar AHMG, Khan A, Ahmad N, Ahmad S, et al. *Boswellia serrata* extract attenuates inflammatory mediators and oxidative stress in collagen induced arthritis. *Phytomedicine* [Internet]. 2014;21(6):847–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.02.001>
  11. Rheumatoid Arthritis Drug Guide [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 29]. Available from: <https://www.webmd.com/rheumatoid-arthritis/rheumatoid-arthritis-medications#1>
  12. Pisetsky DS. Advances in the treatment of rheumatoid arthritis: costs and challenges. *N C Med J* [Internet]. 2017;78(5):337–40. Available from: <https://www.ncmedicaljournal.com/content/ncm/78/5/337.full.pdf>
  13. Black RJ, Richards B, Lester S, Buchbinder R, Barrett C, Lassere M, et al. Factors associated with commencing and ceasing opioid therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 2019;49(3):351–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.06.003>
  14. Liberman JS, D’Agostino McGowan L, Greevy RA, Morrow JA, Griffin MR, Roumie CL, et al. Mental health conditions and the risk of chronic opioid therapy among patients with rheumatoid arthritis: a retrospective veterans affairs cohort study. *Clin Rheumatol*. 2020;39(6):1793–802.

15. Costello RE, Marsden A, Movahedi M, Lunt M, Humphreys JH, Emsley R, et al. The effect of glucocorticoid therapy on mortality in patients with rheumatoid arthritis and concomitant type II diabetes: a retrospective cohort study. *BMC Rheumatol.* 2020;4:4.
16. Anaya JM. The autoimmune tautology. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):147.
17. Marincola FM. Autoimmunity. Anaya J-M, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R, editors. *Autoimmunity: From Bench to Bedside.* Bogota(Colombia); 2013.
18. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia.* Lidel, editor. 2012. 351 p [cited 2020 Apr 3].
19. Chen S, Pu W, Guo S, Jin L, He D, Wang J. Genome-wide DNA methylation profiles reveal common epigenetic patterns of interferon-related genes in multiple autoimmune diseases. *Front Genet.* 2019;10:223.
20. Valesini G, Gerardi MC, Iannuccelli C, Pacucci VA, Pendolino M, Shoenfeld Y. Citrullination and autoimmunity [Internet]. *Mosaic of Autoimmunity: The Novel Factors of Autoimmune Diseases.* Elsevier Inc.; 2019 [cited 2020 Mar 20]. p. 117–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814307-0.00014-1>
21. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia.* Lidel, editor. 2012. 105 p [cited 2020 Apr 3].
22. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia.* Lidel, editor. 2012. 34 p [cited 2020 Apr 4]
23. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia.* Lidel, editor. 2012. 343 p [cited 2020 Apr 4].
24. Chevalier N, Tan JK, Mason LJ, Robert R, McKenzie CI, Lim F, et al. Avenues to autoimmune arthritis triggered by diverse remote inflammatory challenges. *J Autoimmun* [Internet]. 2016;73:120–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.06.018>
25. Lerner A, Jeremias P, Matthias T. The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int J Celiac Dis.* 2015;3(4):151–5.

26. Wright HL, Cox T, Moots RJ, Edwards SW. Neutrophil biomarkers predict response to therapy with tumor necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol.* 2017;101(3):785–95.
27. Bartlett DB, Willis LH, Slentz CA, Hoselton A, Kelly L, Huebner JL, et al. Ten weeks of high-intensity interval walk training is associated with reduced disease activity and improved innate immune function in older adults with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):127.
28. Zhao X, Liu Z, Shu D, Xiong Y, He M, Xu S, et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis and the effect of non-surgical periodontal treatment on disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit.* 2018;24:5802–10.
29. Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2014;48–49:26–30.
30. Rocha C, Serras R, Carvalho MA. Importância do diagnóstico precoce na artrite reumatoide; contributo do diagnóstico in vitro. *Apifarma.* 2017. p. 1–57.
31. Queiroz MV de. Doenças reumáticas: manual de auto-ajuda para adultos. In Lisboa: DGS; 2006. p. 32.
32. Roy N, Tanner K, Merrill RM, Wright C, Miller KL, Kendall KA. Descriptive epidemiology of voice disorders in rheumatoid arthritis: prevalence, risk factors, and quality of life burden. *J Voice [Internet].* 2016;30(1):74–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvoice.2015.02.011>
33. Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician.* 2011;84(11):1245–52.
34. Lucas R, Monjardino MT. O estado da reumatologia em Portugal [Internet]. ONDOR - Observatório Nacional das Doenças Reumáticas. 2010 [cited 2020 Jul 3]. p. 1–129. Available from: [http://pns.dgs.log.pt/files/2010/05/ONDOR\\_Estado\\_Reumatologia\\_Portugal-1.pdf](http://pns.dgs.log.pt/files/2010/05/ONDOR_Estado_Reumatologia_Portugal-1.pdf)
35. Branco JC, Faustino A, Carvalho B, Araújo F, Canhão H, Brito I, et al. Rede nacional de especialidade hospitalar e de referência: reumatologia [Internet].

- 2015 [cited 2020 Jun 24]. Available from: <https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2016/11/RRH-CCT.pdf>
36. Alivernini S, Tolusso B, Petricca L, Ferraccioli G, Gremese E. Rheumatoid arthritis. In: *Mosaic of Autoimmunity: The Novel Factors of Autoimmune Diseases* [Internet]. Elsevier Inc.; 2019. p. 501–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814307-0.00046-3>
  37. Cope AP. Rheumatoid arthritis. In: *Clinical Immunology* [Internet]. Fifth Edit. Elsevier Ltd; 2019 [cited 2020 Apr 8]. p. 705-721.e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00052-1>
  38. Gerlag DM, Raza K, Van Baarsen LGM, Brouwer E, Buckley CD, Burmester GR, et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the study group for risk factors for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(5):638–41.
  39. van Steenberg HW, van Nies JAB, Huizinga TWJ, Bloem JL, Reijniere M, Van Der Helm-Van Mil AHM, et al. Characterising arthralgia in the preclinical phase of rheumatoid arthritis using MRI. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1225–32.
  40. Newsum EC, van der Helm-van Mil AHM, Kaptein AA. Views on clinically suspect arthralgia: a focus group study. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2016;35(5):1347–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-015-3038-3>
  41. van Steenberg HW, Aletaha D, Beart-Van De Voorde LJJ, Brouwer E, Codreanu C, Combe B, et al. EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(3):491–6.
  42. De Hair MJH, van De Sande MGH, Ramwadhoebe TH, Hansson M, Landewé R, Van Der Leij C, et al. Features of the synovium of individuals at risk of developing rheumatoid arthritis : Implications for understanding preclinical rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(3):513–22.
  43. van De Sande MGH, de Hair MJH, van Der Leij C, Klarenbeek PL, Bos WH, Smith MD, et al. Different stages of rheumatoid arthritis: features of the synovium in the preclinical phase. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(5):772–7.

44. Deane KD, Demourelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pr Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2018;31(1):3–18. Available from: <http://www.cnn.com/interactive/2015/10/world/dadaab-refugees/>
45. Gerlag DM, Norris JM, Tak PP. Towards prevention of autoantibody-positive rheumatoid arthritis: from lifestyle modification to preventive treatment. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2016;55(4):607–14.
46. Raza K, Holers VM, Gerlag D. Nomenclature for the phases of the development of rheumatoid arthritis. *Clin Ther* [Internet]. 2019;41(7):1279–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.04.013>
47. Burgers LE, Van Steenbergen HW, Ten Brinck RM, Huizinga TWJ, Van Der Helm-van Mil AHM. Differences in the symptomatic phase preceding ACPA-positive and ACPA-negative RA: a longitudinal study in arthralgia during progression to clinical arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(10):1751–4.
48. Deane KD, O'Donnell CI, Hueber W, Majka DS, Lazar AA, Derber LA, et al. The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner. *Arthritis Rheum*. 2010;62(11):3161–72.
49. Kokkonen H, Söderström I, Rocklöv J, Hallmans G, Lejon K, Dahlqvist SR. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(2):383–91.
50. Brink M, Hansson M, Mathsson L, Jakobsson PJ, Holmdahl R, Stenlund H, et al. Multiplex analyses of antibodies against citrullinated peptides in individuals prior to development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013;65(4):899–910.
51. Demourelle MK, Weisman MH, Simonian PL, Lynch DA, Sachs PB, Pedraza IF, et al. Airways abnormalities and rheumatoid arthritis-related autoantibodies in subjects without arthritis: early injury or initiating site of autoimmunity? *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1756–61.
52. ten Brinck RM, van Steenbergen HW, Mangnus L, Burgers LE, Reijniere M, Huizinga TWJ, et al. Functional limitations in the phase of clinically suspect arthralgia are as serious as in early clinical arthritis; a longitudinal study. *RMD*

Open. 2017;3(1):e000419.

53. Stack J. RJ, van Tuyl LHD, Sloots M, Van De Stadt LA, Hoogland W, Maat B, et al. Symptom complexes in patients with seropositive arthralgia and in patients newly diagnosed with rheumatoid arthritis: a qualitative exploration of symptom development. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2014;53(9):1646–53.
54. Burgers LE, Nieuwenhuis WP, van Steenberg HW, Newsum EC, Huizinga TWJ, Reijniere M, et al. Magnetic resonance imaging-detected inflammation is associated with functional disability in early arthritis-results of a cross-sectional study. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2016;55(12):2167–75.
55. Kuijper TM, Luime JJ, Alves C, Barendregt PJ, Van Zeben J, Bindels PJE, et al. Quality of life and health care use in patients with arthralgias without synovitis compared with patients diagnosed with early rheumatoid arthritis: data from an early arthritis cohort. *Arthritis Care Res*. 2014;66(3):379–86.
56. Joki J, Kay J, Ring D. Hand rheumatoid arthritis [Internet]. 4th ed. Frontera WR, Silver JK, Rizzo TD, editors. *Essentials of Physical Medicine and Rehabilitation*. Philadelphia, USA: Elsevier; 2019 [cited 2020 Apr 8]. 179–184 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-54947-9.00034-1>
57. Legrand J, Kirchgessner T, Sokolova T, Vande Berg B, Durez P. Early clinical response and long-term radiographic progression in recent-onset rheumatoid arthritis: clinical remission within six months remains the treatment target. *Jt Bone Spine [Internet]*. 2019;86(5):594–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2019.03.008>
58. Katchamart W, Koolvisoot A, Aromdee E, Chiowchanwesawakit P, Muengchan C. Associations of rheumatoid factor and anti-citrullinated peptide antibody with disease progression and treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2015;35(10):1693–9.
59. Mouterde G, Rincheval N, Lukas C, Daien C, Saraux A, Dieudé P, et al. Outcome of patients with early arthritis without rheumatoid factor and ACPA and predictors of rheumatoid arthritis in the ESPOIR cohort. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):140.
60. He Y, Tang J, Wu B, Yang B, Ou Q, Lin J. Correlation between albumin to

- fibrinogen ratio, C-reactive protein to albumin ratio and Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020;500:149–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.009>
61. Shen R, Ren X, Jing R, Shen X, Chen J, Ju S, et al. Rheumatoid factor, anti-cyclic citrullinated peptide antibody, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate for the clinical diagnosis of rheumatoid arthritis. *Lab Med*. 2015;46(3):226–9.
  62. Sudoł-Szopińska I, Jans L, Teh J. Reumatoid arthritis: what do MRI and ultrasound show. *J Ultrason*. 2017;17(68):5–16.
  63. Salaffi F, Gutierrez M, Carotti M. Ultrasound versus conventional radiography in the assessment of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(1 Suppl 80):S85-90.
  64. Infantino M, Manfredi M, Meacci F, Sarzi-Puttini P, Ricci C, Atzeni F, et al. Anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor isotypes in the diagnosis of rheumatoid arthritis: an assessment of combined tests. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2014;436:237–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.05.019>
  65. Lingampalli N, Sokolove J, Lahey LJ, Edison JD, Gilliland WR, Holers VM, et al. Combination of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor is associated with increased systemic inflammatory mediators and more rapid progression from preclinical to clinical rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* [Internet]. 2018;195:119–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.05.004>
  66. Waller DG, Sampson AP. Rheumatoid arthritis, other inflammatory arthritides and osteoarthritis. In: *Medical Pharmacology and Therapeutics*. 5th ed. 2018. p. 373–83.
  67. Byram K, Chinratanalab S, Sergent J. Rheumatoid arthritis [Internet]. Frontera WR, Silver JK, Rizzo TD, editors. *Essentials of Physical Medicine and Rehabilitation*. Philadelphia, USA: Elsevier; 2019 [cited 2020 Apr 8]. 876–881 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54947-9.00152-8>
  68. Alemao E, Iannaccone CK, Weinblatt ME, Shadick NA. Association of changes

- in anticitrullinated protein antibody levels with resource use and disease activity measures in rheumatoid arthritis patients a US observational cohort. *Clin Ther* [Internet]. 2019;41(6):1057-1065.e3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.04.029>
69. Verheul MK, Fearon U, Trouw LA, Veale DJ. Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. *Clin Immunol* [Internet]. 2015;161(1):2–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2015.04.005>
  70. Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med*. 2007;120(11):936–9.
  71. Narváez JA, Narváez J, de Lama E, de Albert M. MR imaging of early rheumatoid arthritis. *Radiographics*. 2010;30(1):143–63.
  72. Seegobin SD, Ma MHY, Dahanayake C, Cope AP, Scott DL, Lewis CM, et al. ACPA-positive and ACPA-negative rheumatoid arthritis differ in their requirements for combination DMARDs and corticosteroids. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R13.
  73. Balandraud N, Picard C, Reviron D, Landais C, Toussirot E, Lambert N, et al. HLA-DRB1 genotypes and the risk of developing anti citrullinated protein antibody (ACPA) positive rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2013;8(5):e64108.
  74. Grosse J, Allado E, Roux C, Pierreisnard A, Couderc M, Clerc-Urmes I, et al. ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis: two distinct erosive disease entities on radiography and ultrasonography. *Rheumatol Int* [Internet]. 2020;40(4):615–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00296-019-04492-5>
  75. Kocijan R, Harre U, Schett G. ACPA and bone loss in rheumatoid arthritis topical collection on rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(10):366.
  76. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*. 2012;122(5):1791–802.
  77. Bitik B, Mercan R, Tufan A, Tezcan E, Kucuk H, Ilhan M, et al. Differential diagnosis of elevated erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein levels: a rheumatology perspective. *Eur J Rheumatol*. 2015;2(4):131–4.

78. Kotulska A, Kopeć-Mędrek M, Grosicka A, Kubicka M, Kucharz EJ. Correlation between erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein level in patients with rheumatic diseases. *Reumatologia*. 2015;53(5):243–6.
79. Tishkowski K G V. Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) [Internet]. Treasure I. StatPearls. 2020 [cited 2020 Sep 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/>
80. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 63–64 p [cited 2020 Apr 13].
81. Li W, Sasso EH, Van Der Helm-van Mil AHM, Huizinga TWJ. Relationship of multi-biomarker disease activity score and other risk factors with radiographic progression in an observational study of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2016;55(2):357–66.
82. Sudoł-Szopińska I, Jans L, Teh J. Rheumatoid arthritis: what do MRI and ultrasound show. *J Ultrason*. 2017;17(68):5–16.
83. Amin MF, Ismail FM, El Shereef RR. The role of ultrasonography in early detection and monitoring of shoulder erosions, and disease activity in rheumatoid arthritis patients; comparison with MRI examination. *Acad Radiol* [Internet]. 2012;19(6):693–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acra.2012.02.010>
84. Boeters DM, Nieuwenhuis WP, Verheul MK, Newsum EC, Reijnierse M, Toes REM, et al. MRI-detected osteitis is not associated with the presence or level of ACPA alone, but with the combined presence of ACPA and RF. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2016;18:179. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-016-1076-0>
85. O’Brien A, Backman C. Inflammatory arthritis. In: *Rheumatology: Evidence-Based Practice for Physiotherapists and Occupational Therapists* [Internet]. Elsevier Limited; 2010 [cited 2020 Apr 19]. p. 211–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-443-06934-5.00016-4>
86. Tua Saúde [Internet]. [cited 2020 Jul 5]. Available from: <https://www.tuasaude.com/derrame-articular/>

87. Hedström AK, Rönnelid J, Klareskog L, Alfredsson L. Complex relationships of smoking, HLA–DRB1 genes, and serologic profiles in patients with early rheumatoid arthritis: update from a swedish population-based case–control study. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1504–11.
88. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* [Internet]. 2020;110:102400. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102400>
89. Chen B, Sun L, Zhang X. Integration of microbiome and epigenome to decipher the pathogenesis of autoimmune diseases. *J Autoimmun* [Internet]. 2017;83:31–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.009>
90. Frese S, Weigert A, Hoppe B, Feldkötter M, Ludwig M, Weber S, et al. A classic twin study of lower urinary tract obstruction: report of 3 cases and literature review. *LUTS Low Urin Tract Symptoms*. 2018;11(2):O85–8.
91. Langan D, Kim EY, Moudgil KD. Modulation of autoimmune arthritis by environmental ‘hygiene’ and commensal microbiota. *Cell Immunol* [Internet]. 2019;339:59–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.12.005>
92. Mok A, Rhead B, Hologue C, Shao X, Quach HL, Quach D, et al. Hypomethylation of CYP2E1 and DUSP22 promoters associated with disease activity and erosive disease among rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheumatol*. 2018;70(4):528–36.
93. Mourad J, Monem F. HLA-DRB1 allele association with rheumatoid arthritis susceptibility and severity in Syria. *Rev Bras Reumatol (English Ed)* [Internet]. 2013;53(1):47–56. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2255-5021\(13\)70005-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2255-5021(13)70005-1)
94. Delgado De La Poza JF, Cantó E, Díaz-Torné C, Ferrer Villahoz B, Martínez Carretero MA, López M, et al. Contribution of LILRB1 polymorphism and HLA-DRB1-shared epitope to rheumatoid arthritis. *Inmunologia* [Internet]. 2011;30(4):108–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2011.06.004>
95. Soliman AF, Egaila SE-S, Ali AI, Azab NI, Al-Gohary HH. HLA-DRB1 alleles in Egyptian rheumatoid arthritis patients: relations to anti-cyclic citrullinated

- peptide antibodies, disease activity and severity. *Egypt Rheumatol* [Internet]. 2016;38(4):269–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejr.2016.03.007>
96. Auger I, Balandraud N, Massy E, Hemon M, Peen E, Arnoux F, et al. Peptidyl arginine deiminase autoimmunity and the development of ACPA in rheumatoid arthritis: the hapten–carrier model. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(6):903–11.
  97. Kokkonen H, Brink M, Hansson M, Lassen E, Mathsson-Alm L, Holmdahl R, et al. Associations of antibodies against citrullinated peptides with human leukocyte antigen-shared epitope and smoking prior to the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015;17(1):125. Available from: ???
  98. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 122 p [cited 2020 Mar 3].
  99. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 123 p [cited 2020 Mar 3].
  100. Taneja V. Genetic predisposition to autoimmune diseases conferred by the major histocompatibility complex: utility of animal models [Internet]. 5th ed. *The Autoimmune Diseases*. Elsevier Inc.; 2020 [cited 2020 Jun 26]. p. 467–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812102-3.00026-9>
  101. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 126–127 p [cited 2020 Mar 17].
  102. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 128 p [cited 2020 Mar 17].
  103. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 129 p [cited 2020 Mar 17].
  104. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 130 p [cited 2020 Mar 17].
  105. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 134 p [cited 2020 Mar 17].
  106. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 347 p [cited 2020 Mar 20].

107. Scally SW, Petersen J, Law SC, Dudek NL, Nel HJ, Loh KL, et al. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2013;210(12):2569–82.
108. Alvandpur N, Tabatabaei R, Tahamoli-Roudsari A, Basiri Z, Behzad M, Rezaeepoor M, et al. Circulating IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> T cells and IL-17A producing CD4<sup>+</sup> T cells, HLA-shared epitope and ACPA may characterize the clinical response to therapy in rheumatoid arthritis patients. *Hum Immunol* [Internet]. 2020;81(5):228–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.02.008>
109. Zhao M, Mauer L, Sayles H, Cannon GW, Reimold A, Kerr GS, et al. HLA-DRB1 haplotypes, shared epitope, and disease outcomes in US veterans with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2019;46(7):685–93.
110. Cañas CA, Tobón GJ, Bonilla-Abadía F. The importance of evolution in the development and course of rheumatoid arthritis. *Med Hypotheses*. 2014;82(6):784–91.
111. Roark CL, Anderson KM, Aubrey MT, Rosloniec EF, Freed BM. Arthritogenic peptide binding to DRB1\*01 alleles correlates with susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* [Internet]. 2016;72:25–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.04.006>
112. Ting YT, Petersen J, Ramarathinam SH, Scally SW, Loh KL, Thomas R, et al. The interplay between citrullination and HLA-DRB1 polymorphism in shaping peptide binding hierarchies in rheumatoid arthritis. *J Biol Chem*. 2018;293(9):3236–51.
113. Law SC, Street S, Yu CHA, Capini C, Ramnoruth S, Nel HJ, et al. T-cell autoreactivity to citrullinated autoantigenic peptides in rheumatoid arthritis patients carrying HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R118.
114. de la Rica L, Urquiza JM, Gómez-Cabrero D, Islam ABMMK, López-Bigas N, Tegnér J, et al. Identification of novel markers in rheumatoid arthritis through integrated analysis of DNA methylation and microRNA expression. *J Autoimmun* [Internet]. 2013;41:6–16. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2012.12.005>

115. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. Fundamentos de Imunologia. Lidel, editor. 2012. 321 p [cited 2020 Mar 30].
116. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. Fundamentos de Imunologia. Lidel, editor. 2012. 322 p [cited 2020 Mar 30].
117. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. Fundamentos de Imunologia. Lidel, editor. 2012. 323 p [cited 2020 Mar 30].
118. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. Fundamentos de Imunologia. Lidel, editor. 2012. 326 p [cited 2020 Mar 30].
119. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2010;35(1):10–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.019>
120. Nabi G, Akhter N, Wahid M, Bhatia K, Mandal RK, Dar SA, et al. Meta-analysis reveals PTPN22 1858C/T polymorphism confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Caucasian but not in Asian population. *Autoimmunity*. 2016;49(3):197–210.
121. Muñoz-Valle JF, Padilla-Gutiérrez JR, Hernández-Bello J, Ruiz-Noa Y, Valle Y, Palafox-Sánchez CA, et al. PTPN22 –1123G>C polymorphism and anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Med Clínica (English Ed)*. 2017;149(3):95–100.
122. Mustelin T, Bottini N, Stanford SM. The contribution of PTPN22 to rheumatic disease. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(4):486–95.
123. Vang T, Miletic A V., Bottini N, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. *Autoimmunity*. 2007;40(6):453–61.
124. Raslan HM, Attia HR, Salama I, Ibrahim MH, Hassan EM, El Hussieny MS, et al. Association of PTPN22 1858C→T polymorphism, HLA-DRB1 shared epitope and autoantibodies with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2016;36(8):1167–75.
125. Zheng J, Ibrahim S, Petersen F, Yu X. Meta-analysis reveals an association of

- PTPN22 C1858T with autoimmune diseases, which depends on the localization of the affected tissue. *Genes Immun.* 2012;13(8):641–52.
126. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 324 p [cited 2020 Apr 1].
  127. Ruiz-Noa Y, Hernández-Bello J, Llamas-Covarrubias MA, Palafox-Sánchez CA, Oregon-Romero E, Sánchez-Hernández PE, et al. PTPN22 1858C>T polymorphism is associated with increased CD154 expression and higher CD4+ T cells percentage in rheumatoid arthritis patients. *J Clin Lab Anal.* 2018;33(3):e22710.
  128. Diaz-Gallo LM, Martin J. PTPN22 splice forms: a new role in rheumatoid arthritis. *Genome Med.* 2012;4(2):13.
  129. Bayley R, Yang P, Buckley CD, Young SP. Measuring the specific activity of the protein tyrosine phosphatase lyp. *J Immunol Methods [Internet].* 2013;388(1–2):33–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.11.011>
  130. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 331 p [cited 2020 Mar 30].
  131. Roelsgaard IK, Thomsen T, Østergaard M, Semb AG, Andersen L, Esbensen BA. How do people with rheumatoid arthritis experience participation in a smoking cessation trial: a qualitative study. *Int J Qual Stud Health Well-being [Internet].* 2020;15(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/17482631.2020.1725997>
  132. Vittecoq O, Richard L, Banse C, Lequerré T. The impact of smoking on rheumatoid arthritis outcomes. *Jt Bone Spine.* 2018;85(2):135–8.
  133. Lim K, Jiang M, De Silva T. Rheumatoid arthritis. *Encycl Biomed Gerontol.* 2020;3:162–77.
  134. Dimitroulas T, Sandoo A, Skeoch S, O’Sullivan M, Yessirkepov M, Ayvazyan L, et al. Rheumatoid arthritis. In: *The Heart in Rheumatic, Autoimmune and Inflammatory Diseases: Pathophysiology, Clinical Aspects and Therapeutic Approaches.* 2017. p. 129–65.
  135. Di Giuseppe D, Orsini N, Alfredsson L, Askling J, Wolk A. Cigarette smoking and smoking cessation in relation to risk of rheumatoid arthritis in women.

- Arthritis Res Ther [Internet]. 2013;15(2):R56. Available from: <http://arthritis-research.com/content/15/2/R56>
136. García de Veas Silva JL, González Rodríguez C, Hernández Cruz B. Association of the shared epitope, smoking and the interaction between the two with the presence of autoantibodies (anti-CCP and RF) in patients with rheumatoid arthritis in a hospital in Seville, Spain. *Reumatol Clínica (English Ed [Internet])*. 2019;15(5):289–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reumae.2017.08.010>
  137. Hedström AK, Stawiarz L, Klareskog L, Alfredsson L. Smoking and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Swedish population-based case–control study. *Eur J Epidemiol [Internet]*. 2018;33(4):415–23. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10654-018-0360-5>
  138. Källberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Rönnelid 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*. 2011;70(3):508–11.
  139. Di Giuseppe D, Discacciati A, Orsini N, Wolk A. Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther [Internet]*. 2014;16(2):R61. Available from: *Arthritis Research & Therapy*
  140. Mikuls TR, Sayles H, Yu F, LeVan T, Gould KA, Thiele GM, et al. Associations of cigarette smoking with rheumatoid arthritis in African Americans. *Bone*. 2010;62(12):3560–8.
  141. Bang SY, Lee KH, Cho SK, Lee HS, Lee KW, Bae SC. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. *Arthritis Rheum*. 2010;62(2):369–77.
  142. Karlson EW, Chang SC, Cui J, Chibnik LB, Fraser PA, De Vivo I, et al. Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):54–60.
  143. Bang SY, Lee HS, Lee KW, Bae SC. Interaction of HLA-DRB109:01 and 04:05

- with smoking suggests distinctive mechanisms of rheumatoid arthritis susceptibility beyond the shared epitope. *J Rheumatol*. 2013;40(7):1054–62.
144. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):38–46.
145. Sokolove J, Wagner CA, Lahey LJ, Sayles H, Duryee MJ, Reimold AM, et al. Increased inflammation and disease activity among current cigarette smokers with rheumatoid arthritis: a cross-sectional analysis of US veterans. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(11):1969–77.
146. Mikuls TR, Hughes LB, Westfall AO, Holers VM, Parrish L, Van Der Heijde D, et al. Cigarette smoking, disease severity and autoantibody expression in African Americans with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(11):1529–34.
147. Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am J Med*. 2006;119(6):503.e1-503.e9.
148. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis [Internet]*. 2003;62(9):835–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1754669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
149. Vesperini V, Lukas C, Fautrel B, Le Loet X, Rincheval N, Combe B. Association of tobacco exposure and reduction of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: results from a French multicenter cohort. *Arthritis Care Res*. 2013;65(12):1899–906.
150. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):70–81.
151. Finckh A, Dehler S, Costenbader KH, Gabay C. Cigarette smoking and

- radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(8):1066–71.
152. Westhoff G, Rau R, Zink A. Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(6):849–54.
  153. Demoruelle MK. Mucosa biology and the development of rheumatoid arthritis: potential for prevention by targeting mucosal processes. *Clin Ther [Internet]*. 2019;41(7):1270–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.04.012>
  154. Tong Y, Zheng L, Qing P, Zhao H, Li Y, Su L, et al. Oral microbiota perturbations are linked to high risk for rheumatoid arthritis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;9(475):1–10.
  155. Taylor PC, Narayan N. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. *Med (United Kingdom) [Internet]*. 2018;46(4):207–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.01.010>
  156. Picchianti-Diamanti A, Panebianco C, Salemi S, Sorgi ML, Di Rosa R, Tropea A, et al. Analysis of gut microbiota in rheumatoid arthritis patients: disease-related dysbiosis and modifications induced by etanercept. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):2938.
  157. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 348 p [cited 2020 Apr 3].
  158. Martinelli M, Agmon-Levin N, Amital H, Shoenfeld Y. Infections and autoimmune diseases: an interplay of pathogenic and protective links [Internet]. 2nd ed. *Infection and Autoimmunity*. Elsevier B.V.; 2015. 13–23 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63269-2.00001-5>
  159. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, editor. 2012. 429 p [cited 2020 Apr 4].
  160. Sherina N, Hreggvidsdottir HS, Bengtsson C, Hansson M, Israelsson L, Alfredsson L, et al. Low levels of antibodies against common viruses associate

- with anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis; implications for disease aetiology. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):219.
161. Westergaard MW, Draborg AH, Troelsen L, Jacobsen S, Houen G, Pan HF. Isotypes of Epstein-barr virus antibodies in rheumatoid arthritis: association with rheumatoid factors and citrulline-dependent antibodies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–9.
  162. M. Cardoso E, A. Arosa F, C. Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia.* Lidel, editor. 2012. 436 p [cited 2020 Apr 6].
  163. Newkirk MM, Zbar A, Baron M, Manges AR. Distinct bacterial colonization patterns of escherichia coli subtypes associate with rheumatoid factor status in early inflammatory arthritis. *Rheumatology.* 2010;49(7):1311–6.
  164. Christopoulos G, Christopoulou V, Routsias JG, Babionitakis A, Antoniadis C, Vaiopoulos G. Greek rheumatoid arthritis patients have elevated levels of antibodies against antigens from proteus mirabilis. *Clin Rheumatol.* 2017;36(3):527–35.
  165. Pérez RF, Santamarina P, Fernández AF, Fraga MF. Epigenetics and lifestyle: the impact of stress, diet, and social habits on tissue homeostasis. In: *Epigenetics and Regeneration.* 2019. p. 461–89.
  166. Golbargi B, Najafi A, Mastury S, Golbargi F. Analysis of the epigenetic regulation of TNF receptor superfamily 25 (TNFRSF25) in rheumatoid arthritis. *Gene Reports [Internet].* 2019;16(100424). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100424>
  167. Ham S, Bae JB, Lee S, Kim BJ, Han BG, Kwok SK, et al. Epigenetic analysis in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Exp Mol Med [Internet].* 2019;51(2):22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-019-0215-5>
  168. Guderud K, Sunde LH, Flåm ST, Mæhlen MT, Mjaavatten MD, Lillegraven S, et al. Rheumatoid arthritis patients, both newly diagnosed and methotrexate treated, show more DNA methylation differences in CD4+ memory than in CD4+ naïve T cells. *Front Immunol.* 2020;11:194.
  169. Glossop JR, Emes RD, Nixon NB, Haworth KE, Packham JC, Dawes PT, et al.

- Genome-wide DNA methylation profiling in rheumatoid arthritis identifies disease-associated methylation changes that are distinct to individual T- and B-lymphocyte populations. *Epigenetics*. 2014;9(9):1228–37.
170. Glossop JR, Haworth KE, Emes RD, Nixon NB, Jon C, Dawes PT, et al. DNA methylation profiling of synovial fluid-derived FLS in rheumatoid arthritis reveals common changes relative to tissue-derived FLS. *Epigenomics*. 2015;7(4):539–51.
171. Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(1):110–7.
172. Klein K, Karouzakis E, Gay S. Rheumatoid arthritis and epigenetics. In: *The Epigenetics of Autoimmunity*. 2018. p. 149–66.
173. Shao X, Hudson M, Colmegna I, Greenwood CMT, Fritzler MJ, Awadalla P, et al. Rheumatoid arthritis-relevant DNA methylation changes identified in ACPA-positive asymptomatic individuals using methylome capture sequencing. *Clin Epigenetics*. 2019;11:110.
174. Kato M, Yasuda S, Atsumi T. The role of genetics and epigenetics in rheumatic diseases: are they really a target to be aimed at? *Rheumatol Int* [Internet]. 2018;38(8):1333–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-018-4026-0>
175. Svendsen AJ, Gervin K, Lyle R, Christiansen L, Kyvik K, Junker P, et al. Differentially methylated DNA regions in monozygotic twin pairs discordant for rheumatoid arthritis: an epigenome-wide study. *Front Immunol*. 2016;7:510.
176. Svendsen AJ, Kyvik KO, Houen G, Junker P, Christensen K, Christiansen L, et al. On the origin of rheumatoid arthritis: the impact of environment and genes—a population based twin study. *PLoS One*. 2013;8(2):e57304.
177. Frisell T, Holmqvist M, Källberg H, Klareskog L, Alfredsson L, Askling J. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2773–82.
178. Kuo CF, Grainge MJ, Valdes AM, See LC, Yu KH, Steven Shaw SW, et al.

- Familial aggregation of rheumatoid arthritis and co-aggregation of autoimmune diseases in affected families: a nationwide population-based study. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2017;56(6):928–33.
179. van Der Woude D, Houwing-Duistermaat JJ, Toes REM, Huizinga TWJ, Thomson W, Worthington J, et al. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(4):916–23.
180. He P, Mo X-B, Lei S-F, Deng F-Y. Epigenetically regulated co-expression network of genes significant for rheumatoid arthritis. *Epigenomics*. 2019;11(14):1601–12.
181. Meng W, Zhu Z, Jiang X, Too CL, Uebe S, Jagodic M, et al. DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):71.
182. Nakano K, Boyle DL, Firestein GS. Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol [Internet]*. 2013;190(3):1297–303. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
183. de Andres MC, Perez-Pampin E, Calaza M, Santaclara FJ, Ortea I, Gomez-Reino JJ, et al. Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate. *Arthritis Res Ther [Internet]*. 2015;17(1):233. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0748-5>
184. Wada TT, Araki Y, Sato K, Aizaki Y, Yokota K, Kim YT, et al. Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 2014;444(4):682–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.195>
185. Oh BR, Suh D hyeon, Bae D, Ha N, Choi Y Il, Yoo HJ, et al. Therapeutic effect of a novel histone deacetylase 6 inhibitor, CKD-L, on collagen-induced arthritis in vivo and regulatory T cells in rheumatoid arthritis in vitro. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):154.

186. Webster AP, Plant D, Ecker S, Zufferey F, Bell JT, Feber A, et al. Increased DNA methylation variability in rheumatoid arthritis-discordant monozygotic twins. *Genome Med.* 2018;10(64):1–12.
187. Van Steenberg HW, Luijk R, Shoemaker R, Heijmans BT, Huizinga TWJ, van der Helm-van Mil AHM. Differential methylation within the major histocompatibility complex region in rheumatoid arthritis: a replication study. *Rheumatol (United Kingdom).* 2014;53(12):2317–8.
188. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Runarsson A, Reinius L, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol.* 2013;31(2):142–7.
189. Julià A, Absher D, López-Lasanta M, Palau N, Pluma A, Waite Jones L, et al. Epigenome-wide association study of rheumatoid arthritis identifies differentially methylated loci in B cells. *Hum Mol Genet.* 2017;26(14):2803–11.
190. Park SH, Kim SK, Choe JY, Moon Y, An S, Park MJ, et al. Hypermethylation of EBF3 and IRX1 genes in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Mol Cells.* 2013;35(4):298–304.
191. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009;60(12):3613–22.
192. Ai R, Hammaker D, Boyle DL, Morgan R, Walsh AM, Fan S, et al. Joint-specific DNA methylation and transcriptome signatures in rheumatoid arthritis identify distinct pathogenic processes. *Nat Commun.* 2016;7(11849).
193. Whitaker JW, Shoemaker R, Boyle DL, Hillman J, Anderson D, Wang W, et al. An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype. *Genome Med [Internet].* 2013;5(4):40. Available from: <http://genomemedicine.com/content/5/4/40>
194. Karouzakis E, Raza K, Kolling C, Buckley CD, Gay S, Filer A, et al. Analysis of early changes in DNA methylation in synovial fibroblasts of RA patients before diagnosis. *Sci Rep [Internet].* 2018;8(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24240-2>

195. Gupta B, Jaiswal KS, Ghosh A, Raghav SK. Epigenetics and epigenomics analysis for autoimmune diseases. In: Computational Epigenetics and Diseases [Internet]. Elsevier Inc.; 2019. p. 365–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814513-5.00022-2>
196. Altorok N, Nada S, Nagaraja V, Kahaleh B. Epigenetics in bone and joint disorders [Internet]. Vol. 17, Medical Epigenetics. Elsevier Inc.; 2016. 295–314 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803239-8/00017-X>
197. Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M. Increased recycling of polyamines is associated with global DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1809–17.
198. Tóth DM, Ocskó T, Balog A, Markovics A, Mikecz K, Kovács L, et al. Amelioration of autoimmune arthritis in mice treated With the DNA methyltransferase inhibitor 5'-azacytidine. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(8):1265–75.
199. Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Sato K, Yokota K, Fujimoto K, et al. Histone methylation and STAT-3 differentially regulate interleukin-6-induced matrix metalloproteinase gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(5):1111–23.
200. Castro-Villegas C, Pérez-Sánchez C, Escudero A, Filipescu I, Verdu M, Ruiz-Limón P, et al. Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF $\alpha$ . *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):49.
201. Yang S, Yang Y. Downregulation of microRNA-221 decreases migration and invasion in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2395–401.
202. Singh A, Patro PS, Aggarwal A. MicroRNA-132, miR-146a, and miR-155 as potential biomarkers of methotrexate response in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2019;38(3):877–84.
203. Liu J, Fei D, Xing J, Du J. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;96:173–81. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.120>
204. Hong BK, You S, Yoo SA, Park D, Hwang D, Cho CS, et al. MicroRNA-143 and-145 modulate the phenotype of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med* [Internet]. 2017;49:e363. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2017.108>
  205. Liu Y, Qian K, Li C, Ma Y, Chen X. Roles of microRNA-539 and osteopontin in rheumatoid arthritis. *Exp Ther Med*. 2018;15(3):2681–7.
  206. Zhao M, Li Y, Xiao W. Anti-apoptotic effect of interleukin-22 on fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis is mediated via the signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway. *Int J Rheum Dis*. 2017;20(2):214–24.
  207. Gao J, Zhou XL, Kong RN, Ji LM, He LL, Zhao DB. MicroRNA-126 targeting PIK3R2 promotes rheumatoid arthritis synovial fibroblasts proliferation and resistance to apoptosis by regulating PI3K/AKT pathway. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2016;100(1):192–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.12.015>
  208. Li XF, Shen WW, Sun YY, Li WX, Sun ZH, Liu YH, et al. MicroRNA-20a negatively regulates expression of NLRP3-inflammasome by targeting TXNIP in adjuvant-induced arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Jt Bone Spine* [Internet]. 2016;83(6):695–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2015.10.007>
  209. Philippe L, Alsaleh G, Pichot A, Ostermann E, Zuber G, Frisch B, et al. MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(6):1071–9.
  210. Migita K, Iwanaga N, Izumi Y, Kawahara C, Kumagai K, Nakamura T, et al. TNF- $\alpha$ -induced miR-155 regulates IL-6 signaling in rheumatoid synovial fibroblasts. *BMC Res Notes*. 2017;10:403.
  211. Maeda Y, Farina NH, Matzelle MM, Fanning PJ, Lian JB, Gravallesse EM. Synovium-derived MicroRNAs regulate bone pathways in rheumatoid arthritis. *J Bone Miner Res*. 2017;32(3):461–72.

212. Yang G, Wu D, Zeng G, Jiang O, Yuan P, Huang S, et al. Correlation between miR-126 expression and DNA hypomethylation of CD4<sup>+</sup> T cells in rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(8):8929–36.
213. Ciechomska M, Bonek K, Merdas M, Zarecki P, Swierkot J, Gluszko P, et al. Changes in MiRNA-5196 expression as a potential biomarker of anti-TNF- $\alpha$  therapy in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2018;66(5):389–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-018-0513-y>
214. Iwamoto N, Fukui S, Takatani A, Shimizu T, Umeda M, Nishino A, et al. Osteogenic differentiation of fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis is induced by microRNA-218 through a ROBO/Slit pathway. *Arthritis Res Ther*. 2018;20:189.
215. Li Y, Zhou M, Lv X, Song L, Zhang D, He Y, et al. Reduced activity of HDAC3 and increased acetylation of histones H3 in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol Res*. 2018;2018(79):1–10.
216. Oh BR, Suh D hyeon, Bae D, Ha N, Choi Y Il, Yoo HJ, et al. Therapeutic effect of a novel histone deacetylase 6 inhibitor, CKD-L, on collagen-induced arthritis in vivo and regulatory T cells in rheumatoid arthritis in vitro. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):1–16.
217. Toussirot E, Abbas W, Khan KA, Tissot M, Jeudy A, Baud L, et al. Imbalance between HAT and HDAC Activities in the PBMCs of patients with ankylosing Spondylitis or rheumatoid Arthritis and influence of HDAC Inhibitors on TNF alpha production. *PLoS One*. 2013;8(8):1–10.
218. Angiolilli C, Grabiec AM, Ferguson BS, Ospelt C, Fernandez BM, van Es IE, et al. Inflammatory cytokines epigenetically regulate rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing HDAC5 expression. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(2):430–8.
219. Meng M, Liu H, Chen S, Zhao H, Gao X, Zhang J, et al. Methylation of H3K27 and H3K4 in key gene promoter regions of thymus in RA mice is involved in the abnormal development and differentiation of iNKT cells. *Immunogenetics*. 2019;71(7):489–99.

220. Yi L, Li Z, Hu T, Liu J, Li N, Cao X, et al. Intracellular HSP70L1 inhibits human dendritic cell maturation by promoting suppressive H3K27me3 and H2AK119Ub1 histone modifications. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020;17(1):85–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-018-0195-8>
221. Northrup D, Yagi R, Cui K, Proctor WR, Wang C, Placek K, et al. Histone demethylases UTX and JMJD3 are required for NKT cell development in mice. *Cell Biosci*. 2017;7(1):1–14.
222. Zhang Y, Ji T, Ma S, Wu W. MLL1 promotes migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by activating the TRIF/NF- $\kappa$ B signaling pathway via H3K4me3 enrichment in the TLR4 promoter region. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2020;82:106220. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106220>
223. Salem RM, El-deeb A, Elsergany M, Elsaadany H, El-khouly R. Intra-articular injection of etanercept versus glucocorticoids in rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol*. 2020;
224. Kuijper TM, Folmer R, Stolk EA, Hazes JMW, Luime JJ. Doctors' preferences in de-escalating DMARDs in rheumatoid arthritis: a discrete choice experiment. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):78.
225. Lorscheider M, Tsapis N, Ur-Rehman M, Gaudin F, Stolfa I, Abreu S, et al. Dexamethasone palmitate nanoparticles: an efficient treatment for rheumatoid arthritis. *J Control Release* [Internet]. 2019;296:179–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.015>
226. Pavelka K, Akkoç N, Al-Maini M, Zerbini CAF, Karateev DE, Nasonov EL, et al. Maintenance of remission with combination etanercept–DMARD therapy versus DMARDs alone in active rheumatoid arthritis: results of an international treat-to-target study conducted in regions with limited biologic access. *Rheumatol Int*. 2017;37(9):1469–79.
227. Curtis JR, Trivedi M, Haraoui B, Emery P, Park GS, Collier DH, et al. Defining and characterizing sustained remission in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2018;37(4):885–93.
228. Sung YK, Yoshida K, Prince FHM, Frits ML, Cho SK, Choe JY, et al.

- Prevalence and predictors for sustained remission in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2019;14(4):e0214981.
229. Barati A, Jamshidi AR, Aghazadeh Z, Mirshafiey A. Effects of  $\beta$ -D-mannuronic acid, as a novel non-steroidal anti-inflammatory medication within immunosuppressive properties, on IL17, ROR $\gamma$  t, IL4 and GATA3 gene expressions in rheumatoid arthritis patients. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2017;11:1027–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S129419>
230. Piovezana Bossolani GD, Silva BT, Colombo Martins Perles JV, Lima MM, Vieira Frez FC, Garcia de Souza SR, et al. Rheumatoid arthritis induces enteric neurodegeneration and jejunal inflammation, and quercetin promotes neuroprotective and anti-inflammatory actions. *Life Sci* [Internet]. 2019;238:116956. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116956>
231. Do TTH, Garcia M, Dalle H, Dorothée G, Moldes M, Fève B, et al. Glucocorticoid-induced insulin resistance is related to macrophage visceral adipose tissue infiltration. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019;185:150–62.
232. Bickham K, Kivitz AJ, Mehta A, Frontera N, Shah S, Stryszak P, et al. Evaluation of two doses of etoricoxib, a COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), in the treatment of rheumatoid arthritis in a double-blind, randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2016;17:331. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12891-016-1170-0>
233. Tasaki S, Suzuki K, Kassai Y, Takeshita M, Murota A, Kondo Y, et al. Multi-omics monitoring of drug response in rheumatoid arthritis in pursuit of molecular remission. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1):2755. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05044-4>
234. Baddack-Werncke U, Busch-Dienstfertig M, González-Rodríguez S, Maddila SC, Grobe J, Lipp M, et al. Cytotoxic T cells modulate inflammation and endogenous opioid analgesia in chronic arthritis. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):30.
235. Hu W, Fu W, Wei X, Yang Y, Lu C, Liu Z. A network pharmacology study on the active ingredients and potential targets of *Tripterygium wilfordii* Hook for treatment of reumatoid arthritis. *Evidence-based Complement Altern Med*.

- 2019;2019:15.
236. Chung S-J, Park H-J, Park M-C. Cost-effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs adjusting for upper and lower gastrointestinal toxicities in rheumatoid arthritis patients. *J Rheum Dis.* 2017;24(1):27.
  237. Sugimoto M, Toda Y, Hori M, Mitani A, Ichihara T, Sekine S, et al. Topical anti-inflammatory and analgesic affects of multiple applications of S(+)-Flurbiprofen Plaster (SFPP) in a rat adjuvant-induced arthritis model. *Drug Dev Res.* 2016;77(4):206–11.
  238. Korani M, Jamshidi M. The effect of aqueous extract of *Trachyspermum ammi* seeds and ibuprofen on inflammatory gene expression in the cartilage tissue of rats with collagen-induced arthritis. *J Inflamm Res.* 2020;13:133–9.
  239. Weintraub WS. Safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur Heart J.* 2017;38(44):3293–5.
  240. 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.
  241. Close R, Bale P, Armon K. Use of non-inflammatory drugs in paediatrics. *Arch Dis Child - Educ Pract.* 2020;0:1–6.
  242. Combe B, Landewe R, Daien CI, Hua C, Aletaha D, Álvaro-Gracia JM, et al. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):948–59.
  243. Shabbir A, Shahzad M, Ali A, Zia-ur-Rehman M. Discovery of new benzothiazine derivative as modulator of pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Inflammation* [Internet]. 2016;39(6):1918–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-016-0427-y>
  244. Bijlsma JWJ, Jacobs JWG, Buttgerit F. Glucocorticoids in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2015;33(4 Suppl 92):S34-6.
  245. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids-mechanisms of action in health and disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016;42(1):15–31.

246. He B, Cruz-Topete D, Oakley RH, Xiao X, Cidlowski A. Human glucocorticoid receptor  $\square$  regulates gluconeogenesis and inflammation in mouse liver. *Mol Cell Biol*. 2015;36(5):714–30.
247. Hill MJ, Suzuki S, Segars JH, Kino T. CRTC2 is a coactivator of GR and couples GR and CREB in the regulation of hepatic gluconeogenesis. *Mol Endocrinol*. 2016;30(1):104–17.
248. Hu X, Wang Y, Sheikahmadi A, Li X, Buyse J, Lin H, et al. Effects of glucocorticoids on lipid metabolism and AMPK in broiler chickens' liver. *Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol* [Internet]. 2019;232:23–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.02.001>
249. Wu T, Jiang J, Yang L, Li H, Zhang W, Chen Y, et al. Timing of glucocorticoid administration determines severity of lipid metabolism and behavioral effects in rats. *Chronobiol Int* [Internet]. 2017;34(1):78–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/07420528.2016.1238831>
250. Miyata M, Lee JY, Susuki-Miyata S, Wang WY, Xu H, Kai H, et al. Glucocorticoids suppress inflammation via the upregulation of negative regulator IRAK-M. *Nat Commun*. 2015;6:6062.
251. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(1–2):20–32.
252. de Guia RM. Stress, glucocorticoid signaling pathway, and metabolic disorders. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2020;14(5):1273–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.06.038>
253. Trampisch US, Krause D, Trampisch HJ, Klaassen-Mielke R, Baraliakos X, Braun J. Comparison of the efficacy and safety of two starting dosages of prednisolone in early active rheumatoid arthritis (CORRA): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014;15(1):344.
254. Pappas DA, Etzel CJ, Zlotnick S, Best J, Blachley T, Kremer JM. Patterns of prednisone use in patients with rheumatoid arthritis initiating treatment with tocilizumab in routine US clinical practice. *Rheumatol Ther* [Internet]. 2019;6(3):421–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40744-019-0162-6>

255. Verschueren P, De Cock D, Corluy L, Joos R, Langenaken C, Taelman V, et al. Effectiveness of methotrexate with step-down glucocorticoid remission induction (COBRA Slim) versus other intensive treatment strategies for early rheumatoid arthritis in a treat-to-target approach: 1-year results of CareRA, a randomised pragmatic open-1a. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(3):511–20.
256. Charles-Schoeman C, Van Der Heijde D, Burmester GR, Nash P, Zerbini CAF, Connell CA, et al. Effect of glucocorticoids on the clinical and radiographic efficacy of tofacitinib in patients with rheumatoid arthritis: a posthoc analysis of data from 6 phase III studies. *J Rheumatol*. 2018;45(2):177–87.
257. 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)*. 2016;68(1):1–26.
258. Buttgereit F, Strand V, Lee EB, Simon-Campos A, McCabe D, Genet A, et al. Fosdagrocorat (PF-04171327) versus prednisone or placebo in rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, multicentre, phase IIb study. *RMD Open*. 2019;5(1):e000889.
259. Listing J, Kekow J, Manger B, Burmester G-R, Pattloch D, Zink A, et al. Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNF $\alpha$  inhibitors and rituximab. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(2):415–21.
260. Hetland ML, Østergaard M, Ejbjerg B, Jacobsen S, Stengaard-Pedersen K, Junker P, et al. Short- and long-term efficacy of intra-articular injections with betamethasone as part of a treat-to-target strategy in early rheumatoid arthritis: impact of joint area, repeated injections, MRI findings, anti-CCP, IgM-RF and CRP. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(6):851–6.
261. Weatherley B, McFadyen L, Tammara B. Population pharmacokinetics of Fosdagrocorat (PF-04171327), a dissociated glucocorticoid receptor agonist, in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Transl Sci*. 2018;11(1):54–62.
262. O’Dell JR, Mikuls TR, Taylor TH, Ahluwalia V, Brophy M, Warren SR, et al. Therapies for active rheumatoid arthritis after methotrexate failure. *N Engl J Med*. 2013;369(4):307–18.

263. Benjamin O, Bansal P, Amandeep G, Lappin SL. Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARD) [Internet]. Treasure I. StatPearls. 2020 [cited 2020 Aug 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507863/>
264. Leonardo N, Lester S, Graham M, Barrett C, Whittle S, Rowett D, et al. Selection and perception of methotrexate treatment information in people with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2020;23(6):805–12.
265. Manai M, Van Middendorp H, Veldhuijzen DS, Van Der Pol JA, Huizinga TWJ, Evers AWM. Pharmacological conditioning in the treatment of recent-onset rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial study protocol. *Trials*. 2020;21(1):15.
266. Kiely P, Busby AD, Nikiphorou E, Sullivan K, Walsh DA, Creamer P, et al. Is incident rheumatoid arthritis interstitial lung disease associated with methotrexate treatment? Results from a multivariate analysis in the ERAS and ERAN inception cohorts. *BMJ Open*. 2019;9(5):e028466.
267. Smolen JS, Pangan AL, Emery P, Rigby W, Tanaka Y, Vargas JI, et al. Upadacitinib as monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate (select-monotherapy): a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 3 study. *Lancet*. 2019;393(10188):2303–231.
268. Cansu DÜ, Teke HÜ, Bodakçi E, Korkmaz C. How should we manage low-dose methotrexate-induced pancytopenia in patients with rheumatoid arthritis? *Clin Rheumatol*. 2018;37(12):3419–25.
269. Bujor AM, Janjua S, LaValley MP, Duran J, Braun J, Felson DT. Comparison of oral versus parenteral methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221823.
270. Dougados M, Van Der Heijde D, Chen YC, Greenwald M, Drescher E, Liu J, et al. Baricitinib in patients with inadequate response or intolerance to conventional synthetic DMARDs: Results from the RA-BUILD study. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):88–95.
271. Park D-J, Choi SJ, Shin K, Kim H-A, Park Y-B, Kang SW, et al. Switching profiles in a population-based cohort of rheumatoid arthritis receiving biologic

- therapy: results from the KOBIO registry. *Clin Rheumatol*. 2017;36(5):1013–22.
272. Nakamura S, Suzuki K, Iijima H, Hata Y, Lim CR, Ishizawa Y, et al. Identification of baseline gene expression signatures predicting therapeutic responses to three biologic agents in rheumatoid arthritis: a retrospective observational study. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2016;18:159. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-016-1052-8>
273. Winthrop KL, Saag K, Cascino MD, Pei J, John A, Jahreis A, et al. Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: : analysis from the SUNSTONE registry. *Arthritis Care Res*. 2019;71(8):993–1003.
274. Virkki LM, Valleala H, Takakubo Y, Vuotila J, Relas H, Komulainen R, et al. Outcomes of switching anti-TNF drugs in rheumatoid arthritis-a study based on observational data from the finnish register of biological treatment (ROB-FIN). *Clin Rheumatol*. 2011;30(11):1447–54.
275. Lu YC, Chuang CH, Chuang KH, Chen IJ, Huang BC, Lee WH, et al. Specific activation of pro-infliximab enhances selectivity and safety of rheumatoid arthritis therapy. *PLoS Biol*. 2019;17(6):e3000286.
276. Takeuchi T, Yamanaka H, Harigai M, Tamamura R, Kato Y, Ukyo Y, et al. Sirukumab in rheumatoid arthritis refractory to sulfasalazine or methotrexate: a randomized phase 3 safety and efficacy study in Japanese patients. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):42.
277. Cagnotto G, Willim M, Nilsson JÅ, Compagno M, Jacobsson LTH, Saevarsdottir S, et al. Abatacept in rheumatoid arthritis: survival on drug, clinical outcomes, and their predictors - data from a large national quality register. *Arthritis Res Ther*. 2020;22(1):15.
278. Sarmiento-Monroy JC, Parada-Arias L, Rodríguez-López M, Rodríguez-Jiménez M, Molano-González N, Rojas-Villarraga A, et al. Subcutaneous abatacept in rheumatoid arthritis: a real-life experience. *J Transl Autoimmun*. 2019;2:100016.
279. Alten R, Kaine J, Keystone E, Nash P, Delaet I, Genovese MC. Long-term safety of subcutaneous abatacept in rheumatoid arthritis: integrated analysis of clinical trial data representing more than four years of treatment. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(8):1987–97.

280. Iannone F, Ferraccioli G, Sinigaglia L, Favalli EG, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, et al. Real-world experience of tocilizumab in rheumatoid arthritis: sub-analysis of data from the Italian biologics' register GISEA. *Clin Rheumatol*. 2018;37(2):315–21.
281. Salmon JH, Perotin JM, Morel J, Dramé M, Cantagrel A, Ziegler LE, et al. Serious infusion-related reaction after rituximab, abatacept and tocilizumab in rheumatoid arthritis: prospective registry data. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(1):134–9.
282. de Jong TD, Sellam J, Agca R, Vosslander S, Witte BI, Tsang-A-Sjoe M, et al. A multi-parameter response prediction model for rituximab in rheumatoid arthritis. *Jt Bone Spine [Internet]*. 2018;85(2):219–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2017.02.015>
283. Quattrocchi E, Østergaard M, Taylor PC, Van Vollenhoven RF, Chu M, Mallett S, et al. Safety of repeated open-label treatment courses of intravenous ofatumumab, a human anti-CD20 monoclonal antibody, in rheumatoid arthritis: results from three clinical trials. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157961.
284. Boyle DL, Soma K, Hodge J, Kavanaugh A, Mandel D, Mease P, et al. The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1311–6.
285. Telliez JB, Dowty ME, Wang L, Jussif J, Lin T, Li L, et al. Discovery of a JAK3-selective inhibitor: functional differentiation of JAK3-selective inhibition over pan-JAK or JAK1-selective inhibition. *ACS Chem Biol*. 2016;11(12):3442–51.
286. Gertel S, Mahagna H, Karmon G, Watad A, Amital H. Tofacitinib attenuates arthritis manifestations and reduces the pathogenic CD4 T cells in adjuvant arthritis rats. *Clin Immunol [Internet]*. 2017;184:77–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2017.04.015>
287. Charles-Schoeman C, Burmester G, Nash P, Zerbini CAF, Soma K, Kwok K, et al. Efficacy and safety of tofacitinib following inadequate response to conventional synthetic or biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(7):1293–301.
288. Iwamoto N, Tsuji S, Takatani A, Shimizu T, Fukui S, Umeda M, et al. Efficacy

- and safety at 24 weeks of daily clinical use of tofacitinib in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177057.
289. Acurcio FA, Moura CS, Bernatsky S, Bessette L, Rahme E. Opioid use and risk of nonvertebral fractures in adults with rheumatoid arthritis: a nested case-control study using administrative databases. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(1):83–91.
290. Wiese AD, Griffin MR, Stein CM, Mitchel EF, Grijalva CG. Opioid analgesics and the risk of serious infections among patients with rheumatoid arthritis: a self-controlled case series study. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(2):323–31.
291. Wiese AD, Griffin MR, Schaffner W, Stein CM, Greevy RA, Mitchel EF, et al. Long-acting opioid use and the risk of serious infections: a retrospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2019;68(11):1862–9.
292. Weber L, Wang X, Ren R, Wei X, Zhao G, Yang J, et al. The development of a macromolecular analgesic for arthritic pain. *Mol Pharm*. 2019;16(3):1234–44.
293. Johnson TA, Sohn J, Inman WD, Bjeldanes LF, Rayburn K. Lipophilic stinging nettle extracts possess potent anti-inflammatory activity, are not cytotoxic and may be superior to traditional tinctures for treating inflammatory disorders. *Phytomedicine* [Internet]. 2013;20(2):143–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.016>
294. Denzler KL, Waters R, Jacobs BL, Rochon Y, Langland JO. Regulation of inflammatory gene expression in PBMCs by immunostimulatory botanicals. *PLoS One*. 2010;5(9):e12561.
295. Nunes JR. *Fitoterapia: proposta completa*. 2008;1–90.
296. Rambod M, Nazarinia M, Raieskarimian F. The prevalence and predictors of herbal medicines usage among adult rheumatoid arthritis patients: a case-control study. *Complement Ther Med* [Internet]. 2018;41:220–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2018.10.004>
297. Venkatesha SH, Yu H, Rajaiah R, Tong L, Moudgil KD. Celastrus-derived celastrol suppresses autoimmune arthritis by modulating antigen-induced cellular and humoral effector responses. *J Biol Chem*. 2011;286(17):14138–46.
298. Ramadan G, Al-Kahtani MA, El-Sayed WM. Anti-inflammatory and anti-oxidant

- properties of *curcuma longa* (turmeric) versus *Zingiber officinale* (ginger) rhizomes in rat adjuvant-induced arthritis. *Inflammation*. 2011;34(4):291–301.
299. Nanjundaiah SM, Venkatesha SH, Yu H, Tong L, Stains JP, Moudgil KD. Celastrol and its bioactive celastrol protect against bone damage in autoimmune arthritis by modulating osteoimmune cross-talk. *J Biol Chem*. 2012;287(26):22216–26.
300. Jacob J, Amalraj A, Raj KKJ, Divya C, Kunnumakkara AB, Gopi S. A novel bioavailable hydrogenated curcuminoids formulation (CuroWhite™) improves symptoms and diagnostic indicators in rheumatoid arthritis patients - a randomized, double blind and placebo controlled study. *J Tradit Complement Med [Internet]*. 2019;9(4):346–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.06.001>
301. Choi KC, Son YO, Hwang JM, Kim BT, Chae M, Lee JC. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum*. *Pharm Biol [Internet]*. 2017;55(1):611–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1266673>
302. Dudics S, Langan D, Meka RR, Venkatesha SH, Berman BM, Che CT, et al. Natural products for the treatment of autoimmune arthritis: their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2508.
303. Zheng Z, Sun Y, Liu Z, Zhang M, Li C, Cai H. The effect of curcumin and its nanoformulation on adjuvant-induced arthritis in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:4931–42.
304. Liu C, Zhang Y, Kong X, Zhu L, Pang J, Xu Y, et al. Triptolide prevents bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis by targeting RANKL/RANK/OPG signal pathway. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013:62603.
305. Astry B, Venkatesha SH, Laurence A, Christensen-Quick A, Garzinodemo A, Frieman MB, et al. Celastrol, a chinese herbal compound, controls autoimmune inflammation by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells in the target organ. *Clin Immunol*. 2015;157(2):228–38.

306. Alluri VK, Dodda S, Kilari EK, Golakoti T, Sengupta K. Toxicological assessment of a standardized *Boswellia serrata* gum resin extract. *Int J Toxicol*. 2019;38(5):423–35.
307. Aryaeian N, Shahram F, Mahmoudi M, Tavakoli H, Yousefi B, Arablou T. The effect of ginger supplementation on some immunity and inflammation intermediate genes expression in patients with active rheumatoid arthritis. *Gene* [Internet]. 2019;698:179–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.048>
308. Shakibaei M, Allaway D, Nebrich S, Mobasheri A. Botanical extracts from rosehip (*Rosa canina*), willow bark (*Salix alba*), and nettle leaf (*Urtica dioica*) suppress IL-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B activation in canine articular chondrocytes. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012;2012:509383.
309. Martins MAR, Carvalho PJ, Palma AM, Domańska U, Coutinho JAP, Pinho SP. Selecting critical properties of terpenes and terpenoids through group-contribution methods and equations of state. *Ind Eng Chem Res*. 2017;56(35):9895–905.
310. Belcher MS, Mahinthakumar J, Keasling JD. New frontiers: harnessing pivotal advances in microbial engineering for the biosynthesis of plant-derived terpenoids. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2020;65:88–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.001>
311. Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI. Terpenoids. In: *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. 2017. p. 233–66.
312. Yang C, Gao X, Jiang Y, Sun B, Gao F, Yang S. Synergy between methylerythritol phosphate pathway and mevalonate pathway for isoprene production in *Escherichia coli*. *Metab Eng* [Internet]. 2016;37:79–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.05.003>
313. Hansen NL, Heskes AM, Hamberger B, Olsen CE, Hallström BM, Andersen-Ranberg J, et al. The terpene synthase gene family in *Tripterygium wilfordii* harbors a labdane-type diterpene synthase among the monoterpene synthase TPS-b subfamily. *Plant J*. 2017;89(3):429–41.
314. Karl B, Alkhatib Y, Beekmann U, Bellmann T, Blume G, Steiniger F, et al.

- Development and characterization of bacterial nanocellulose loaded with *Boswellia serrata* extract containing nanoemulsions as natural dressing for skin diseases. *Int J Pharm* [Internet]. 2020;587:119635. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119635>
315. Liu Y, Liu Z, Lu C, Li J, Ning Z, Song Z, et al. Comprehensive identification of active triterpenoid metabolites in frankincense using a coupling strategy. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2014;963:90–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.05.054>
  316. Vahabi S, Hakemi-Vala M, Gholami S. In vitro antibacterial effect of hydroalcoholic extract of *Lawsonia inermis*, *Malva sylvestris*, and *Boswellia serrata* on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Adv Biomed Res*. 2019;8:22.
  317. Grabkowska R, Mielicki W, Wielanek M, Wysokińska H. Changes of phenylethanoid and iridoid glycoside distribution in various tissues of shoot cultures and regenerated plants of *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn. *South African J Bot*. 2014;95:159–64.
  318. Rehman S, Nabi B, Baboota S, Ali J. Natural anti-inflammatory agents for the management of osteoarthritis. In: *Discovery and Development of Anti-inflammatory Agents from Natural Products* [Internet]. Elsevier Inc.; 2019. p. 101–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816992-6.00004-8>
  319. Kong X, Zhang Y, Liu C, Guo W, Li X, Su X, et al. Anti-angiogenic effect of triptolide in rheumatoid arthritis by targeting angiogenic cascade. *PLoS One*. 2013;8(10):e77513.
  320. Jiang Q, Tang XP, Chen XC, Xiao H, Liu P, Jiao J. Will Chinese external therapy with compound *Tripterygium wilfordii* hook F gel safely control disease activity in patients with rheumatoid arthritis: design of a double-blinded randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):444.
  321. Goldbach-Mansky R, Wilson M, Fleischmann R, Olsen N, Silverfield J, Kempf P, et al. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F versus sulfasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2009;151(4):229–40.

322. Wang HL, Jiang Q, Feng XH, Zhang HD, Ge L, Luo CG, et al. Tripterygium wilfordii Hook F versus conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs as monotherapy for rheumatoid arthritis: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:215.
323. Bai S, Hu Z, Yang Y, Yin Y, Li W, Wu L, et al. Anti-Inflammatory and neuroprotective effects of triptolide via the NF- $\kappa$ B signaling pathway in a rat MCAO model. *Anat Rec.* 2016;299(2):256–66.
324. Yang Y, Ye Y, Qiu Q, Xiao Y, Huang M, Shi M, et al. Triptolide inhibits the migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes by blocking the activation of the JNK MAPK pathway. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2016;41:8–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.10.005>
325. Lv QW, Zhang W, Shi Q, Zheng WJ, Li X, Chen H, et al. Comparison of Tripterygium wilfordii Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): a randomised, controlled clinical trial. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(6):1078–86.
326. Lin N, Liu C, Xiao C, Jia H, Imada K, Wu H, et al. Triptolide, a diterpenoid triepoxide, suppresses inflammation and cartilage destruction in collagen-induced arthritis mice. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(1):136–46.
327. Su Z, Sun H, Ao M, Zhao C. Atomic force microscopy study of the anti-inflammatory effects of triptolide on rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Microsc Microanal.* 2017;23(5):1002–12.
328. Wang P, Li S, Liu LN, Lv TT, Li XM, Li XP, et al. Circulating osteoprotegerin levels are elevated in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2017;36(10):2193–200.
329. Fang Z, He D, Yu B, Liu F, Zuo J, Li Y, et al. High-throughput study of the effects of celastrol on activated fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Genes (Basel).* 2017;8(9):221.
330. Mu XY, Zhao LC, Zhang ZX. Molecular analysis of chinese celastrus and tripterygium and implications in medicinal and pharmacological studies. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169973.

331. Wang Y, Li C, Gu J, Chen C, Duanmu J, Miao J, et al. Celastrol exerts anti-inflammatory effect in liver fibrosis via activation of AMPK-SIRT3 signalling. *J Cell Mol Med.* 2020;24(1):941–53.
332. Venkatesh HN, Sudharshana TN, Abhishek RU, Thippeswamy S, Manjunath K, Mohana DC. Antifungal and antimycotoxigenic properties of chemically characterised essential oil of *Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr. *Int J Food Prop* [Internet]. 2017;20(S2):1856–68. Available from: <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354882>
333. Ismail IE, Abdelnour SA, Shehata SA, Abd El-Hack ME, El-Edel MA, Taha AE, et al. Effect of dietary boswellia serrata resin on growth performance, blood biochemistry, and cecal microbiota of growing rabbits. *Front Vet Sci.* 2019;6:471.
334. Yang F, Cho WY, Lee N, Kim DH, Lee J, Lee HJ, et al. Effects of *Boswellia serrata* and whey protein powders on physicochemical properties of pork patties. *Foods.* 2020;9(3):334.
335. Van Vuuren SF, Kamatou GPP, Viljoen AM. Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. *South African J Bot* [Internet]. 2010;76(4):686–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.06.001>
336. Scior T, Verhoff M, Gutierrez-Aztatzi I, Ammon HPT, Laufer S, Werz O. Interference of boswellic acids with the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor. *J Chem Inf Model.* 2014;54(3):978–86.
337. Shenvi S, Kiran KR, Kumar K, Diwakar L, Reddy GC. Synthesis and biological evaluation of boswellic acid-NSAID hybrid molecules as anti-inflammatory and anti-arthritic agents. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2015;98:170–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.001>
338. Beghelli D, Isani G, Roncada P, Andreani G, Bistoni O, Bertocchi M, et al. Antioxidant and ex vivo immune system regulatory properties of *Boswellia serrata* extracts. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7468064.
339. Miscioscia E, Shmalberg J, Scott KC. Measurement of 3-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and 11-keto-beta-boswellic acid in *Boswellia serrata* supplements

- administered to dogs. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):270.
340. Johnson S, Decarlo A, Satyal P, Dosoky NS, Sorensen A, Setzer WN. Organic certification is not enough: the case of the methoxydecane frankincense. *Plants.* 2019;8(4):88.
341. Ayub MA, Hanif MA, Sarfraz RA, Shahid M. Biological activity of *Boswellia serrata* Roxb. oleo gum resin essential oil: effects of extraction by supercritical carbon dioxide and traditional methods. *Int J Food Prop* [Internet]. 2018;21(1):808–20. Available from: <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1439957>
342. Majeed M, Majeed S, Narayanan NK, Nagabhushanam K. A pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess the safety and efficacy of a novel *Boswellia serrata* extract in the management of osteoarthritis of the knee. *Phyther Res.* 2019;33(5):1457–68.
343. Katragunta K, Siva B, Kondepudi N, Vadaparathi PRR, Rama Rao N, Tiwari AK, et al. Estimation of boswellic acids in herbal formulations containing *Boswellia serrata* extract and comprehensive characterization of secondary metabolites using UPLC-Q-Tof-MSe. *J Pharm Anal* [Internet]. 2019;9(6):414–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.09.007>
344. Bertocchi M, Isani G, Medici F, Andreani G, Usca IT, Roncada P, et al. Anti-inflammatory activity of *Boswellia serrata* extracts: an in vitro study on porcine aortic endothelial cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:2504305.
345. Ranjbarnejad T, Saidijam M, Moradkhani S, Najafi R. Methanolic extract of *Boswellia serrata* exhibits anti-cancer activities by targeting microsomal prostaglandin E synthase-1 in human colon cancer cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2017;131:1–8.
346. Ranzato E, Martinotti S, Volante A, Tava A, Masini MA, Burlando B. The major *Boswellia serrata* active 3-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid strengthens interleukin-1 $\alpha$  upregulation of matrix metalloproteinase-9 via JNK MAP kinase activation. *Phytomedicine* [Internet]. 2017;36:176–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.010>
347. Meka B, Ravada SR, Murali Krishna Kumar M, Purna Nagasree K, Golakoti T.

- Synthesis of new analogs of AKBA and evaluation of their anti-inflammatory activities. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2017;25(4):1374–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.045>
348. Sengupta K, Kolla JN, Krishnaraju A V., Yalamanchili N, Rao C V., Golakoti T, et al. Cellular and molecular mechanisms of anti-inflammatory effect of Aflapin: a novel *Boswellia serrata* extract. *Mol Cell Biochem*. 2011;354(1–2):189–97.
349. Baram SM, Karima S, Shateri S, Tafakhori A, Fotouhi A, Lima BS, et al. Functional improvement and immune-inflammatory cytokines profile of ischaemic stroke patients after treatment with boswellic acids: a randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2019;27(6):1101–12. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00627-z>
350. Singh S, Khajuria A, Taneja SC, Johri RK, Singh J, Qazi GN. Boswellic acids: a leukotriene inhibitor also effective through topical application in inflammatory disorders. *Phytomedicine*. 2008;15(6–7):400–7.
351. Sharma A, Bhatia S, Kharya MD, Gajbhiye V, Ganesh N, Namdeo AG, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of different fractions of *Boswellia serrata*. *Int J Phytomedicine*. 2010;2(1):94–9.
352. Mehta M, Dureja H, Garg M. Development and optimization of boswellic acid-loaded proniosomal gel. *Drug Deliv*. 2016;23(8):3072–81.
353. Skarke C, Kuczka K, Tausch L, Werz O, Rossmannith T, Barrett JS, et al. Increased bioavailability of 11-keto- $\beta$ -boswellic acid following single oral dose frankincense extract administration after a standardized meal in healthy male volunteers: modeling and simulation considerations for evaluating drug exposures. *J Clin Pharmacol*. 2012;52(10):1592–600.
354. Niphadkar SS, Bokhale NB, Rathod VK. Extraction of acetyl 11-keto- $\beta$ -boswellic acid (AKBA) from *Boswellia serrata* plant oleo gum resin using novel three phase partitioning (TPP) technique. *J Appl Res Med Aromat Plants* [Internet]. 2017;7:41–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.04.007>
355. Ismail S, Rao K, Bhaskar M. Evaluation of anti-inflammatory activity of

- Boswellia serrata on carrageenan induced paw edema in albino Wistar rats. *Int J Res Med Sci.* 2016;4(7):2980–6.
356. Kumar R, Singh S, Kumar A, Saksena RP, Riddhi J, Kumar R. Effect of *Boswellia serrata* extract on acute inflammatory parameters and tumor necrosis factor- $\alpha$  in complete Freund's adjuvant-induced animal model of rheumatoid arthritis abstract. *Int J Appl Basic Med Res.* 2019;9(2):100–6.
357. Georgiev MI, Alipieva KI, Denev P. Antioxidant activity and bioactive constituents of the aerial parts of *harpagophytum procumbens* plants. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2010;24(2):438–43.
358. Gyurkovska V, Alipieva K, Maciuk A, Dimitrova P, Ivanovska N, Haas C, et al. Anti-inflammatory activity of Devil's claw in vitro systems and their active constituents. *Food Chem [Internet].* 2011;125(1):171–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.056>
359. Rahimi A, Razmkhah K, Mehrnia M, Mohamadnia A, Sahebamee H, Salehi S, et al. Molecular docking and binding study of harpagoside and harpagide as novel anti-inflammatory and anti-analgesic compound from *harpagophytum procumbens* based on their interactions with COX-2 enzyme. *Asian Pacific J Trop Dis [Internet].* 2016;6(3):227–31. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)61019-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61019-2)
360. Parenti C, Aricò G, Pennisi M, Venditti A, Scoto GM. *Harpagophytum procumbens* extract potentiates morphine antinociception in neuropathic rats. *Nat Prod Res.* 2016;30(11):1248–55.
361. Avato P, Argentieri MP. Quality assessment of commercial spagyric tinctures of *harpagophytum procumbens* and their antioxidant properties. *Molecules.* 2019;24(12):2251.
362. Locatelli M, Ferrante C, Carradori S, Secci D, Leporini L, Chiavaroli A, et al. Optimization of aqueous extraction and biological activity of *harpagophytum procumbens* root on ex vivo rat colon inflammatory model. *Phyther Res.* 2017;31(6):937–44.
363. Schopohl P, Grüneberg P, Melzig MF. The influence of harpagoside and harpagide on TNF $\alpha$ -secretion and cell adhesion molecule mRNA-expression in

- IFN $\gamma$ /LPS-stimulated THP-1 cells. *Fitoterapia*. 2016;110:157–65.
364. Kriukova A, Vladymyrova I, Levashova O, Tishakova T. Determination of amino acid composition in the harpagophytum procumbens root. *Dhaka Univ J Pharm Sci*. 2019;18(1):85–91.
365. Babili F El, Fouraste I, Rougaignon C, Moulis C, Chatelain C. Anatomical study of secondary tuberized roots of harpagophytum procumbens DC and quantification of harpagoside by high-performance liquid chromatography method. *Pharmacogn Mag*. 2012;8(30):175–80.
366. Bairu MW, Amoo SO, van Staden J. Comparative phytochemical analysis of wild and in vitro-derived greenhouse-grown tubers, in vitro shoots and callus-like basal tissues of Harpagophytum procumbens. *South African J Bot [Internet]*. 2011;77(2):479–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.09.009>
367. Ouitas NA, Heard CM. A novel ex vivo skin model for the assessment of the potential transcutaneous anti-inflammatory effect of topically applied harpagophytum procumbens extract. *Int J Pharm*. 2009;376(1–2):63–8.
368. Kim TK, Park KS. Inhibitory effects of harpagoside on TNF- $\alpha$ -induced pro-inflammatory adipokine expression through PPAR- $\gamma$  activation in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine [Internet]*. 2015;76(2):368–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.015>
369. Fiebich BL, Muñoz E, Rose T, Weiss G, McGregor GP. Molecular targets of the antiinflammatory Harpagophytum procumbens (Devil's claw): Inhibition of TNF $\alpha$  and COX-2 gene expression by preventing activation of AP-1. *Phyther Res*. 2012;26(6):806–11.
370. Chun HW, Kim SJ, Pham TH, Bak Y, Oh J, Ryu HW, et al. Epimagnolin A inhibits IL-6 production by inhibiting p38/NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways in PMA-stimulated THP-1 cells. *Environ Toxicol*. 2019;34(7):796–803.
371. Garmus TT, Paviani LC, Queiroga CL, Magalhães PM, Cabral FA. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *J Supercrit Fluids [Internet]*. 2014;86:4–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.014>

372. Tohma H, Gülçin İ, Bursal E, Gören AC, Alwasel SH, Köksal E. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. *J Food Meas Charact* [Internet]. 2017;11(2):556–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11694-016-9423-z>
373. Yoon CH, Chung SJ, Lee SW, Park YB, Lee SK, Park MC. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Jt Bone Spine* [Internet]. 2013;80(3):274–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.08.010>
374. Tyskiewicz K, Konkol M, Rój E. The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. *Molecules*. 2018;23(10):2625.
375. Ma D, Sun D, Wang C, Li Y, Guo T. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2014;80:60–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.024>
376. Pizzi A. Tannins: prospectives and actual industrial applications. *Biomolecules*. 2019;9(8):344.
377. Aizpurua-Olaizola O, Ormazabal M, Vallejo A, Olivares M, Navarro P, Etxebarria N, et al. Optimization of supercritical fluid consecutive extractions of fatty Acids and polyphenols from *Vitis Vinifera* grape wastes. *J Food Sci*. 2015;80(1):E101–7.
378. Albiero LR, de Andrade MF, Marchi LF, Landi-Librandi AP, de Figueiredo-Rinhel ASG, Carvalho CA, et al. Immunomodulating action of the 3-phenylcoumarin derivative 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin in neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and in rats with acute joint inflammation. *Inflamm Res* [Internet]. 2020;69(1):115–30. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01298-w>
379. Rao PS, Ramanjaneyulu YS, Prisk VR, Schurgers LJ. A combination of tamarindus indica seeds and curcuma longa rhizome extracts improves knee joint function and alleviates pain in non-arthritic adults following physical activity. *Int*

- J Med Sci. 2019;16(6):845–53.
380. Teng H, Seuseu KT, Lee WY, Chen L. Comparing the effects of microwave radiation on 6-gingerol and 6-shogaol from ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Rosc). PLoS One. 2019;14(6):e0214893.
381. Furlan V, Bren U. Protective effects of [6]-gingerol against chemical carcinogens : mechanistic insights. Int J Mol Sci. 2020;21(3):695.
382. Ramirez-Ahumada M del C, Timmermann BN, Gang DR. Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. Phytochemistry. 2006;67(18):2017–29.
383. Grevsen K, Fretté XC, Christensen LP. Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial parts of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) are affected by nitrogen fertilization and by harvest time. Eur J Hortic Sci. 2008;73(1):20–7.
384. Yildiz E, Gungor G, Yilmaz H, Gocmen D. Changes in bioaccessibility, phenolic content and antioxidant capacity of novel crackers with turmeric (*Curcuma longa* L.) and mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) powders. Qual Assur Saf Crop Foods. 2019;11(2):107–16.
385. Anna KT, Suhana MRE, Das S, Faizah O, Hamzaini AH. Anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* (turmeric) on collagen-induced arthritis : an anatomico-radiological study. Clin Ther. 2011;162(3):201–7.
386. Pearson W, Kott LS. A biological extract of turmeric (*Curcuma longa*) modulates response of cartilage explants to lipopolysaccharide. BMC Complement Altern Med. 2019;19:252.
387. Aggarwal ML, Chacko KM, Kuruvilla BT. Systematic and comprehensive investigation of the toxicity of curcuminoid-essential oil complex: a bioavailable turmeric formulation. Mol Med Rep. 2016;13(1):592–604.
388. Choi Y, Ban I, Lee H, Baik MY, Kim W. Puffing as a novel process to enhance the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Curcuma longa* l. (turmeric). Antioxidants. 2019;8(11):506.

389. Funk JL, Frye JB, Oyarzo JN, Zhang H, Timmermann BN. Anti-arthritic effects and toxicity of the essential oils of turmeric (*Curcuma longa* L.). *J Agric Food Chem.* 2010;58(2):842–9.
390. Hwang K-W, Son D, Jo H-W, Kim CH, Seong KC, Moon JK. Levels of curcuminoid and essential oil compositions in turmeric (*Curcuma longa* L.) grown in Korea. *Appl Biol Chem.* 2016;59(2):209–15.
391. Amalraj A, Varma K, Jacob J, Divya C, Kunnumakkara AB, Stohs SJ, et al. A novel highly bioavailable curcumin formulation improves symptoms and diagnostic indicators in rheumatoid arthritis patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, two-dose, three-arm, and parallel-group study. *J Med Food.* 2017;20(10):1022–30.
392. Alghadir A, Miraj M, Ali S. Efficacy of curcumin with iontophoretic application on paw edema and hematological responses in collagen-induced arthritis rat models. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2020;2020:4606520.
393. Shang W, Zhao L-J, Dong X-L, Zhao Z-M, Li J, Zhang B-B, et al. Curcumin inhibits osteoclastogenic potential in PBMCs from rheumatoid arthritis patients via the suppression of MAPK/RANK/c-Fos/NFATc1 signaling pathways. *Mol Med Rep.* 2016;14(4):3620–6.
394. Chandrasekaran C, Sundarajan K, Edwin J, Gururaja G, Mundkinajeddu D, Agarwal A. Immune-stimulatory and anti-inflammatory activities of *Curcuma longa* extract and its polysaccharide fraction. *Pharmacognosy Res.* 2013;5(2):71–9.
395. Khan MRU, Raza SM, Hussain M. Formulation and in vitro evaluation of cream containing diclofenac sodium and *Curcuma Longa* for the management of rheumatoid arthritis. *Int J Pharma Sci.* 2014;4(4):654–60.
396. Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K. Preclinical toxicology and anticholangiocarcinoma activity of oral formulation of a standardized extract of *Zingiber Officinale*. *Planta Med.* 2020;86(2):104–12.
397. Mutthuraj D, Vinutha T, Gopenath T, Kagineelli B, Karthikeyan M, Ashok G, et al. Inhibition of pro-inflammatory molecules by ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its anti-inflammatory effects on arthritis patients. *J Drug Deliv Ther.*

- 2020;10(2-s):125–39.
398. Choi YY, Kim MH, Hong J, Kim S-H, Yang WM. Dried ginger (*Zingiber officinalis*) inhibits inflammation in a lipopolysaccharide-induced mouse model. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013:914563.
  399. Hwang JH, Jung HW, Oh SY, Kang JS, Kim JP, Park YK. Effects of *Zingiber officinale* extract on collagen-induced arthritis in mice and IL-1 $\beta$ -induced inflammation in human synovial fibroblasts. *Eur J Inflamm*. 2017;15(3):168–78.
  400. Airaodion AI, Ogbuagu U, Ogbuagu EO, Airaodion EO, Agunbiade AP, Oloruntoba AP, et al. Investigation of aqueous extract of *Zingiber officinale* root potential in the prevention of peptic ulcer in albino rats. *Int J Res Innov Appl Sci*. 2019;4(2):64–7.
  401. Ezzat SM, Ezzat MI, Okba MM, Menze ET, Abdel-Naim AB. The hidden mechanism beyond ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) potent in vivo and in vitro anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2018;214:113–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.019>
  402. Lee HY, Park SH, Lee M, Kim H-J, Ryu SY, Kim ND, et al. 1-Dehydro-[10]-gingerdione from ginger inhibits IKK $\beta$  activity for NF- $\kappa$ B activation and suppresses NF- $\kappa$ B-regulated expression of inflammatory genes. *Br J Pharmacol*. 2012;167(1):128–40.
  403. Murugesan S, Venkateswaran MR, Jayabal S, Periyasamy S. Evaluation of the antioxidant and anti-arthritic potential of *Zingiber officinale* Rosc. by in vitro and in silico analysis. *South African J Bot* [Internet]. 2020;130:45–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.019>
  404. Lee TY, Lee KC, Chen SY, Chang HH. 6-Gingerol inhibits ROS and iNOS through the suppression of PKC- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B pathways in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009;382(1):134–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.160>
  405. Ruangsuriya J, Budprom P, Viriyakhasem N, Kongdang P, Chokchaitaweek C, Sirikaew N, et al. Suppression of cartilage degradation by zingerone involving the p38 and JNK MAPK signaling pathway. *Planta Med*. 2017;83(3–04):268–76.

406. Bonetti G, Tedeschi P, Meca G, Bertelli D, Mañes J, Brandolini V, et al. In vitro bioaccessibility, transepithelial transport and antioxidant activity of *Urtica dioica* L. phenolic compounds in nettle based food products. *Food Funct*. 2016;7(10):4222–30.
407. Seiman DD, Batalu A, Seiman CD, Ciopec M, Udrea AM, Motoc M, et al. Pharmacological effects of natural compounds extracted from *urtica dioica* evaluated by in silico and experimental methods. *Rev Chim*. 2018;69(9):2377–81.
408. Đurović S, Pavlić B, Šorgić S, Popov S, Savić S, Pertoničević M, et al. Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *J Funct Foods*. 2017;32:18–26.
409. Zemmouri H, Sekiou O, Ammar S, El Feki A, Bouaziz M, Messarah M, et al. *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharm Biol* [Internet]. 2017;55(1):1561–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1310905>
410. Hajhashemi V, Klooshani V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Urtica dioica* leaf extract in animal models. *Avicenna J phytomedicine* [Internet]. 2013;3(2):193–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050274><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4075706>
411. Zouari Bouassida K, Bardaa S, Khimiri M, Rebaï T, Tounsi S, Jlaïel L, et al. Exploring the *Urtica dioica* leaves hemostatic and wound-healing potential. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1047523.
412. Gorgani SN, Agah S, Shidfar F, Gohari M, Faghihi A. Effects of *Urtica dioica* leaf extract on inflammation, oxidative stress, ESR, blood cell count and quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *J Herb Med* [Internet]. 2017;9:32–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2017.05.002>
413. Hedaya R. Five herbs plus thiamine reduce pain and improve functional mobility in patients with pain: a pilot study. *Altern Ther Health Med*. 2017;23(1):14–9.
414. Arnold E, Benz T, Zapp C, Wink M. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  (cPLA2 $\alpha$ ) by medicinal plants in relation to their phenolic content. *Molecules*.

- 2015;20(8):15033–48.
415. Francišković M, Gonzalez-Pérez R, Orčić D, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O, Svirčev E, et al. Chemical composition and immuno-modulatory effects of *Urtica dioica* L. (stinging nettle) extracts. *Phyther Res*. 2017;31(8):1183–91.
416. Liao J-C, Wei Z-X, Ma Z-P, Zhao C, Cai D-Z. Evaluation of a root extract gel from *Urtica dioica* (Urticaceae) as analgesic and anti-inflammatory therapy in rheumatoid arthritis in mice. *Trop J Pharm Res*. 2016;15(4):781–5.
417. Vogl S, Picker P, Mihaly-Bison J, Fakhrudin N, Atanasov AG, Heiss EH, et al. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine - an unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2013;149(3):750–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.007>
418. Dhouibi R, Affes H, Salem M Ben, Hammami S, Sahnoun Z, Zeghal KM, et al. Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Prog Biophys Mol Biol* [Internet]. 2020;150:67–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.05.008>
419. Winther K, Campbell-Tofte J, Hansen P. Rose hip powder that contains the natural amount of shells and seeds alleviates pain in osteoarthritis of the dominant hand—a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over clinical trial. *Open J Rheumatol Autoimmune Dis*. 2013;3(3):172–80.
420. Phetcharat L, Wongsuphasawat K, Winther K. The effectiveness of a standardized rose hip powder, containing seeds and shells of *Rosa canina*, on cell longevity, skin wrinkles, moisture, and elasticity. *Clin Interv Aging*. 2015;10:1849–56.
421. Türkben C, Uylaşer V, Incedayi B, Çelikkol I. Effects of different maturity periods and processes on nutritional components of rose hip (*Rosa canina* L.). *J Food, Agric Environ*. 2010;8(1):26–30.
422. Demir N, Yildiz O, Alpaslan M, Hayaloglu AA. Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa* L.) fruits in Turkey. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2014;57(1):126–33. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.038>

423. Roman I, Stănilă A, Stănilă S. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chem Cent J*. 2013;7(1):73.
424. Ieri F, Innocenti M, Possieri L, Gallori S, Mulinacci N. Phenolic composition of “bud extracts” of *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L. and *Tilia tomentosa* M. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2015;115:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.06.004>
425. Lin TK, Zhong L, Santiago JL. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):70.
426. Tabatabaee SM, Yusefi MJ, Motevalian M. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of *Rosa Canina* aqueous extract in animal models. *Iran J Pharmacol Ther*. 2017;15:1–6.
427. Christensen R, Tarp S, Altman RD, Henriksen M, Bartels EM, Klokke L, et al. Comparing different preparations and doses of rosehip powder in patients with osteoarthritis of the knee: an exploratory randomized active-controlled trial. *Int J Clin Rheumtol*. 2014;9(3):267–78.
428. Schwager J, Hoeller U, Wolfram S, Richard N. Rose hip and its constituent galactolipids confer cartilage protection by modulating cytokine, and chemokine expression. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11:105.
429. Saaby L, Moesby L, Hansen EW, Christensen SB. Isolation of immunomodulatory triterpene acids from a standardized rose hip powder (*Rosa canina* L.). *Phyther Res*. 2011;25(2):195–201.
430. Willich SN, Rossnagel K, Roll S, Wagner A, Mune O, Erlendson J, et al. Rose hip herbal remedy in patients with rheumatoid arthritis - a randomised controlled trial. *Phytomedicine*. 2010;17(2):87–93.
431. Adams ML, Blouin RA. The role of the pharmacist in health care. *N C Med J*. 2017;78(3):165–7.
432. Lavielle M, Puyraimond-Zemmour D, Romand X, Gossec L, Senbel E, Pouplin S, et al. Methods to improve medication adherence in patients with chronic

- inflammatory rheumatic diseases: a systematic literature review. *RMD Open*. 2018;4(2):e000684.
433. Lee EM, Vasudevan AR, Wee IYJ, Yeow SD, Dinh VTU. Effectiveness and safety of physician–pharmacist collaborative care for rheumatoid arthritis patients: the changi general hospital’s experience. *Proc Singapore Healthc*. 2019;28(3):184–92.
434. Mudhaliar MR, Yiragamreddy SR, Ghouse ISM, Patta J, Tabula U, Kumar P. Impact of clinical pharmacist mediated patient counseling on health related quality of life in rheumatoid arthritis patients in healthcare resource limited settings of india. *Indian J Pharm Pract*. 2016;9(4):247–52.
435. Naqvi AA, Hassali MA, Naqvi SBS, Aftab MT. Impact of pharmacist educational intervention on disease knowledge, rehabilitation and medication adherence, treatment-induced direct cost, health-related quality of life and satisfaction in patients with rheumatoid arthritis: study protocol for a randomi. *Trials*. 2019;20(1):488.
436. Allemann SS, Van Mil JWF, Botermann L, Berger K, Griese N, Hersberger KE. Pharmaceutical care: The PCNE definition 2013. *Int J Clin Pharm*. 2014;36(3):544–55.
437. Hall JJ, Katz SJ, Cor MK. Patient satisfaction with pharmacist-led collaborative follow-up care in an ambulatory rheumatology clinic. *Musculoskeletal Care*. 2017;15(3):186–95.
438. Stockl KM, Shin JS, Lew HC, Zakharyan A, Harada ASM, Solow BK, et al. Outcomes of a rheumatoid arthritis disease therapy. *J Manag Care Pharm*. 2010;16(8):593–604.
439. Phueanpinit P, Pongwecharak J, Krska J, Jarernsripornkul N. Evaluation of community pharmacists’ roles in screening and communication of risks about non-steroidal anti-inflammatory drugs in thailand. *Prim Heal Care Res Dev*. 2018;19(6):598–604.
440. Erickson AK, Bullman WR, Davidson DE. Pharmacists can promote safe use of meds for rheumatoid arthritis. *Pharm Today [Internet]*. 2015;21(3):28. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1042-0991\(15\)30444-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1042-0991(15)30444-8)

