UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

PABLO RAMON GUALBERTO CARDOSO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ENALAPRIL, LOSARTANA E VALSARTANA, BLOQUEADORES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA, EM PBMCS PROVENIENTES DE PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATÓIDE

Recife
2018

PABLO RAMON GUALBERTO CARDOSO

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ENALAPRIL, LOSARTANA E VALSARTANA, BLOQUEADORES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA, EM PBMCS PROVENIENTES DE PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATÓIDE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor do aluno Pablo Ramon Gualberto Cardoso.

Área de Concentração: Inovação Terapêutica

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Co-orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Diniz Lopes Marques

Recife
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Cardoso, Pablo Ramon Gualberto

Avaliação *in vitro* da atividade imunomoduladora do enalopril, losartana e valsartana, bloqueadores do sistema renina-angiotensiva-aldosterona, em PBMCS provenientes de pacientes portadores de artrite reumatóide / Pablo Ramon Gualberto Cardoso - 2018.

122 folhas: il., fig., tab.
Orientador: Maíra Galdino da Rocha Pitta
Coorientadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo
Cláudia Diniz Lopes Marques
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2018.
Inclui referências, apêndices e anexos

1. Artrite reumatóide 2. Enalopril 3. Losartana 4. Valsartana I. Pitta, Maíra Galdino da Rocha (orient.) II. Melo, Moacyr Jesus Barreto de (coorient.) III. Marques, Cláudia Diniz Lopes (coorient.) IV. Título

616.722 7 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2018-393

Elaborado por Claudina Karla Queiroz Ribeiro CRB4/1752

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

PABLO RAMON GUALBERTO CARDOSO

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ENALAPRIL, LOSARTANA E VALSARTANA, BLOQUEADORES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA, EM PBMCS PROVENIENTES DE PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATÓIDE

Recife, 8 de Agosto de 2018

Tese de Doutorado defendida e **APROVADA** em 08 de Agosto de 2018, cuja banca examinadora foi constituída pelos seguintes avaliadores:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Profa. Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly
Instituição: Centro Acadêmico de Vitória – CAV-UFPE
Assinatura:_____

Dra. Ana Karine de Araújo Soares
Instituição: Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica - UPFE
Assinatura:_____

À Oselina Pereira.

A todos os familiares, professores, amigos e colegas que deram força para alcance deste objetivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Talvez tão complexa quanto uma tese foi a escrita dos agradecimentos dos trabalhos acadêmicos dos quais passei. São familiares, amigos, professores, colaboradores que fizeram parte destas trajetórias e todos devem ser lembrados, com o carinho e respeito que merecem.

De início, com certeza tenho que abrir espaço e agradecer aos meus pais Paula Gualberto e Mauro Lemos, que tiveram todo o cuidado em direcionar a pessoa que sou hoje. Trocaram suas horas de lazer, sono e cuidado para uma nova pessoa que estava se formando, crescendo e amadurecendo. Criar um filho não é fácil. E a forma como vocês conduziram essa tarefa me fez ser o homem que sou hoje, e claro, espelho de vocês.

À professora Maira Pitta, a qual me espelho como futuro pesquisador. Desde o inicio da minha carreira acadêmica decidiu apostar na minha pessoa, na monografia, na dissertação do mestrado e agora na minha tese. Por acreditar em mim e investir todo o tempo como orientadora. Pela sua orientação, total apoio, disponibilidade, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, colaboração no solucionar do trabalho e por todo o incentivo direcionado.

Ao professor Moacyr Rêgo, Coorientador, outro exemplo de pesquisador que tenho como espelho, dedicado. Por todo apoio nas correções do trabalho, discussão de resultados, correção de artigos, apoio e incentivo a pensar cada vez mais. Por solucionar dúvidas, plantar sementes de independência ao pesquisar, sugerir e aprimorar sempre que precisou o trabalho realizado.

À professora Cláudia Marques, Co-orientadora, dedicada ao desenvolver do projeto, ao start inicial da nossa pesquisa, recrutamento de pacientes, suporte e apoio sempre que foi solicitado, principalmente na parte clínica da pesquisa.

Ao professor Ivan Pitta, pelo apoio e confiança na minha trajetória pelo NUPITSG, pela oportunidade de pesquisa e crescimento frente aos projetos como colaborador. Pelo tempo, disponibilidade e muito bom humor em trabalhar em conjunto.

À professora Suely Galdino (in memoriam), que me apoiou bastante no inicio da minha carreira como pós-graduando, na seleção do mestrado e, ainda que curta, pela sua orientação neste momento.

À professora Angela Duarte, minha orientadora de iniciação científica, colaboradora pesquisadora, que sempre fez parte do meu desenvolvimento como pesquisador durante todas as etapas. Pelo apoio na parte clínica, no recrutamento dos pacientes, pela disponibilidade em

ajudar, tirar dúvidas, questionar e enriquecer os trabalhos que temos em conjunto, inclusive este.

À professora Michelly Pereira, ótima amiga e colaboradora em projetos, pesquisadora exemplo e com sua dedicação em ajudar sempre, buscando sempre o melhor, seja com apoio emocional ou experimental.

À professora Andrea Marques, também pesquisadora colaboradora, a qual disponibilizou tempo e suporte sempre que necessário, tirando dúvidas ou incentivando a pesquisa, com o suporte necessário.

A Paulo Germano, secretário do PPGIT, o qual sempre se mostrou empenhado em resolver e ajudar fosse em qualquer problema, tornando uma importante peça no concluir deste trabalho.

Ao PPGIT/UFPE, que acolheu meu projeto de pesquisa e ofereceu as condições acadêmicas para o desenvolvimento.

À minha avó (in memoriam) Oselina Pereira, que onde quer que esteja, sei que segue acompanhando seu neto. Lembro bem de como descobrimos a minha aprovação no vestibular da UFPE, ela foi a primeira a saber, e teve uma reação ainda mais animada que a minha, percebendo depois que tamanha alegria vinha com a distância física, pois eu teria que morar distante. Porém isso nunca foi razão para nos afastarmos, ao contrário, só cresceu o amor que temos, e a ela tenho muito a agradecer.

Aos meus avós paternos Abelita e Nilo Lemos (in memoriam), que sempre deram suporte e apoio, principalmente nos encontros da família em sua casa.

Aos meus tios Hiroshi Watanabe, Raunite Gualberto e Sofia Gualberto, todos os três muito importantes no meu desenvolvimento e crescimento no novo estado de Pernambuco, sem dúvida o seu suporte foi essencial para chegar aonde cheguei.

Aos outros tios e tias que, principalmente Jandira e Oselina Gualberto, Euridece Cardoso, embora em regiões distantes, estamos sempre perto, com o apoio de uma família unida.

A Clayton Rodrigues por todo o suporte e apoio, principalmente emocional no meu desenvolvimento e crescimento, por ser uma das primeiras pessoas a perceber e procurar apoiar e solucionar quaisquer que foram as dificuldades encontradas. Por incentivar a querer sempre mais, batalhar e correr atrás dos meus objetivos. Apoiar e confortar nos momentos que foram necessários.

Aos amigos da minha família científica do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, principalmente aos amigos do coração Priscila Stella, Renata

Cavalcanti, Sayonara Gonçalves, Kalebe Silva, Kamila Vilar, Antônio Felix, Mardonny Chagas, Flaviana Alves, Valécia de Cássia, Katherine Aquino, Lucas Souza, Mário Albuquerque e todos os outros que fazem parte da família.

Aos amigos Marcos Dourado, Marcos Regueira, Diogo Castelo Branco, Leonardo Aquino, André Santos, Caio Martins, Fabio Dutra, Adônis Quintas, Polyana Lyra, Juliana Bibiano, Thuanny Marina, Lucas Tavares, Wanessa Senna, e todos os outros que foram e são responsáveis por sempre ajudar nos momentos necessários, afinal, “amigo é a família que nós escolhemos”.

Aos voluntários da pesquisa, pois são primordiais para o desenvolvimento de projetos deste tipo, e uma vez que o avanço da ciência só poderia ser realizado com o apoio destas pessoas que, mesmo que de forma anônima, foram essenciais para o completar deste trabalho.

E, por fim, faço questão de agradecer de coração por todos aqueles que torceram ou incentivaram, mesmo que de forma discreta, pois sem dúvida o apoio de todas as pessoas que fazem parte do meu convívio foi crucial para alcançar o marco deste título.

RESUMO

Artrite Reumatoide (AR) é uma doença crônica, progressiva, degenerativa, que acomete cerca de 1% da população mundial. É comum o paciente com AR desenvolver uma ou mais comorbidades, sendo a mais frequente a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS). O tratamento da AR ainda não oferece cura, mas visa atenuar os sintomas e os danos provocados. Para o tratamento da HAS em pacientes com AR, os medicamentos indicados são o Enalapril ou a Losartana ou a Valsartana. O presente estudo visou detectar novos possíveis alvos marcadores biológicos presentes no soro de pacientes com AR, além de estudar o potencial imunomodulador do Enalapril, Losartana e Valsartana em PBMCs de AR. Foram recrutados 140 pacientes com AR e 40 controles saudáveis pareados por sexo e idade. Para a cultura de PBMCs foram selecionados randomicamente 16 pacientes com AR. Após o consentimento e a coleta do sangue venoso, o soro foi estocado a -80°C e as PBMCs dispostas em cultura na presença dos anti-hipertensivos e estímulo com anti-CD3/anti-CD28 na presença ou não de Enalapril, Losartana e Valsartana. Após isso, o sobrenadante de cultura foi retirado com 6, 24 e 48h de cultura, estocado e utilizado para as dosagens. O extrato proteico para avaliação do NFκB foi obtido através de cultura celular de U937. Foi observado que as citocinas IL-16, IL-18, IL-31 e IL-32 estão aumentadas no soro de pacientes com AR. Em complemento, a Losartana se mostrou o melhor dos anti-hipertensivos com potenciais imunomoduladores em reduzir significativamente os níveis de IFN-γ, IL-6, IL-17F, IL-22 e TNF. Em relação ao NFκB o Enalapril foi capaz de modular a expressão do fator de transcrição reduzindo o seu nível de expressão. As interleucinas 16, 18, 31 e 32 foram encontradas em altos níveis no soro de pacientes AR. Dos medicamentos anti-hipertensivos testados, a Losartana apresenta melhores efeitos imunomoduladores reduzindo significativamente os níveis de IFN-γ, IL-6, IL-17F, IL-22 e TNF em PBMCs de pacientes com AR.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide. Enalapril. Losartana. Valsartana. Citocinas. Inflamação.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, progressive, degenerative disease that affects about 1% of the world's population. It is common for the patient with RA to develop one or more comorbidities and the most frequent being Systemic Arterial Hypertension (SAH). The treatment of RA still does not offer a cure but aims to mitigate the symptoms and the damages caused. For the treatment of SAH in RA patients, the indicated drugs are Enalapril or Losartan or Valsartan. The present study aimed to detect possible new biological marker targets present in the serum of patients with RA, in addition to studying the immunomodulatory potential effects of Enalapril, Losartan and Valsartan in RA PBMCs. We recruited 140 RA patients and 40 healthy controls matched by sex and age. For the culture of PBMCs, 16 RA patients were randomly selected. Following consent and venous blood collection, serum was stored at -80 ° C and PBMCs cultured in the presence of antihypertensives and anti-CD3 / anti-CD28 stimulation in the presence or not of Enalapril, Losartan and Valsartan were made. Thereafter, the culture supernatant was collected with 6, 24 and 48 h of culture, stored and used for the dosages. Protein extract for evaluation of NFκB was obtained through U937 cell culture. Our results show that IL-16, IL-18, IL-31 and IL-32 cytokines are increased in the serum of RA patients. In addition, Losartan has been shown to be the best antihypertensive drug with immunomodulatory potential to significantly reduce levels of IFN-γ, IL-6, IL-17F, IL-22 and TNF. In relation to NFκB Enalapril was able to modulate the expression of the transcription factor reducing its level of expression. Interleukins 16, 18, 31 and 32 were found in high serum levels of RA patients. Of the antihypertensive drugs tested, Losartan has better immunomodulatory effects by significantly reducing the levels of IFN-γ, IL-6, IL-17F, IL-22 and TNF in PBMCs of RA patients' culture.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. Enalapril. Losartan. Valsartan. Cytokine. Inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema ilustrativo da articulação saudável e com AR 27

Figura 2 - Célula T naïve e sua ativação em subtipos de células Th. 28

Figura 3 - Via de Ativação de Fatores Inflamatórios mediados pela ativação do TNFR a partir do TNF, desencadeia a fosforilação do NFκB 30

Figura 4 - Ativação da STAT3 pelo complexo IL-6/IL-6R leva a um aumento de produção de proteínas inflamatórias de fase aguda 31

Figura 5 - Produção de IL-17 pelas células Th17 e ativação de outras células presentes na sinóvia da AR e seus produtos agravantes da doença 34

Figura 6 - Efeitos da Ang II através dos receptores AT1 e AT2 44

Figura 7 - Estrutura química do Enalapril 46

Figura 8 - Estrutura química da Losartana 47

Figura 9 - Estrutura química da Valsartana 48

Figura 10 - Níveis séricos de IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 de pacientes acometidos com AR e no GC 62

Figura 11 - Correlação entre os níveis de IL-16 no soro de pacientes com AR e o valor laboratorial do VSH 64

Figura 12 - Correlação entre os níveis da IL-31 e a idade dos pacientes com AR 65

Figura 13 - Níveis séricos das citocinas IL-18 e IL-31 no soro de pacientes com AR divididos em subgrupos 66

Figura 14 - Associação dos níveis de IL-18 e IL-31 nos pacientes com AR em uso ou não da Leflunomida em índice de atividade da doença em moderado a grave 68

Figura 15 - Níveis de expressão de IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-22 e TNF em sobrenadante de cultura de PBMCs de pacientes com AR após exposição ao Enalapril, Losartana ou Valsartana 70

Figura 16 - Expressão do NFκB em células U937 em cultura com E, L e V a 100μM mostra que o E foi o único a modular o NFκB 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios do Colégio Americano de Reumatologia 1988 para classificação da Artrite Reumatoide 21

Tabela 2 - Classificatórios para a Artrite Reumatoide de 2010 do Colégio Americano de Reumatologia e Liga Europeia Contra o Reumatismo .. 22

Tabela 3 - Terapias utilizadas no tratamento da AR, seus alvos terapêuticos e a disponibilidade no Sistema Único de Saúde 40

Tabela 4 - Parâmetros clínicos e Laboratoriais dos voluntários acometidos com AR e controles saudáveis 59

Tabela 5 - Parâmetros clínicos e Laboratoriais dos voluntários acometidos com AR selecionados para o teste de cultura celular 61

Tabela 6 - Dados clínicos e laboratoriais comparados com os níveis das citocinas séricas dosadas no soro de pacientes AR e os valores estatísticos de p 63

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
aCCP	Anti-peptídeos citrulinado cíclico
Ang II	Angiotensina II
AR	Artrite Reumatóide
B	Linfócitos B
BRA	Bloqueadores do Receptor de Angiotensina
C	Células
CCL	Proteína Quimiotática de Monócitos
CDAI	Índice Clínico de Atividade da Doença (do inglês Clinical Disease Activity Index)
CE	Corticosteroides
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CV	Fator de Risco Cardiovascular
DAS28	Índice de Atividade da Doença contando 28 articulações
DCV	Doença Cardiovascular
E	Enalapril
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ES	Estimuladas
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos(do inglês Food and Drug Administration)
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
L	Losartana
Lef-	Sem uso de Leflunomida
Lef+	Em uso de Leflunomida
MP	Metilprednisona
MTX	Metotrexato
MTX	Metotrexato
NFκB	Fator de Transcrição Nuclear kappa B
PCR	Proteína C Reativa

PPGIT Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Pred Prednisona

PTPN22 Proteína Tirosina Fosfatase

SE Sem Estímulo

SI Sistema Imune

STAT3 Fator de Transcrição Ativado por Tirosina Quinase 3

T Linfócitos T

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF-β Fator de Transformação do Crescimento beta

Th T auxiliares (do inglês T helper)

TNF Fator de Necrose Tumoral

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

V Valsartana

VSH Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20

2.1 ARTRITE REUMATOIDE 20

2.2 DIAGNÓSTICO 21

2.3 ETIOLOGIA 24

2.4 FISIOPATOLOGIA 25

2.4.1 Citocinas Envolvidas na Fisiopatologia da AR 29

2.5 TRATAMENTO DA AR 37

2.6 COMORBIDADES 41

2.7 DOENÇAS CARDIOVASCULARES COMO COMORBIDADES MAIS FREQUENTES NA AR 42

2.8 MEDICAMENTOS ANTAGONISTAS DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA 45

2.8.1 Enalapril 45

2.8.2 Losartana 46

2.8.3 Valsartana 48

3 OBJETIVOS 50

3.1 OBJETIVO GERAL 50

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 50

4 METODOLOGIA 51

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO 51

4.2 TIPO E LOCAL DE ESTUDO 51

4.3 RECRUTAMENTO DE VOLUNTÁRIOS 51

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO 52

4.4.1 Critérios de Inclusão 52

4.4.2 Critérios de Exclusão 52

4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA 52

4.6 COLETA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS 53

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES COM AR E GRUPO CONTROLE E NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE PBMCS DE PACIENTES COM AR 53

4.8 SEPARAÇÃO DE PBMCS PARA OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA 54
4.9 TESTE DE CITOTOXICIDADE POR MTT 54
4.10 AVALIAÇÃO *IN VITRO* NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PBMCS 55
4.10.1 Extração proteica 55
4.10.2 Western Blotting 56
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 56
4.12 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 57
5 RESULTADOS 58
5.1 RESULTADOS SÉRICOS 58
5.1.1 Recrutamento e avaliação clínica, laboratorial e demográfica dos voluntários da pesquisa 58
5.1.2 Avaliação sérica da IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 dos pacientes com AR em comparação ao GC 61
5.1.3 Associação e correlação clínica dos níveis séricos das citocinas IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 com os demais dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com AR 63
5.1.4 Associação da IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 no soro dos pacientes AR e o tratamento utilizado na clínica 65
5.1.5 Avaliação dos níveis séricos de IL-18 e IL-31 com a Leflunomida e a gravidade da doença 67
5.2 RESULTADOS *IN VITRO* EM PBMCS E U937 69
5.2.1 Imunomodulação do Enalapril, Losartana e Valsartana frente a PBMCs de pacientes com Artrite Reumatoide 69
5.2.2 Avaliação do mecanismo de ação do Enalapril, Losartana e Valsartana pelo NFκB frente a células U937 71
6 DISCUSSÃO 72
7 CONCLUSÃO 78
8 PERSPECTIVAS 79
REFERÊNCIAS 80
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 99

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA THE OPEN RHEUMATOLOGY JOURNAL .....….…..... 101

ANEXO A – FICHA CLÍNICA DE ATENDIMENTO DO AMBULATÓRIO DE REUMATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO 116

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA . 118

1 INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica que acomete aproximadamente 1% da população geral, predominantemente no sexo feminino. E associada com dano articular progressivo e irreversível, além de um aumento significativo da mortalidade e redução da qualidade de vida (Symmons e Gabriel, 2011; Smolen *et al.*, 2016).

Diversos fatores são importantes e desencadeadores da AR, dentre eles os mais avaliados são o Fator Reumatóide (FR) e os anticorpos anti-peptídeos citrulinado cíclico (aCCP) aumentados no soro AR e correlacionados com a clínica (Itty *et al.*, 2008). Além disso, o desequilíbrio entre os linfócitos B e T progridem com o avanço da doença, com a produção de autoanticorpos pelas células B (Pala *et al.*, 2018).

Em relação aos linfócitos T, na AR ocorre um desbalanço entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, com predomínio de resposta de células T auxiliares (Th, do inglês T helper) do tipo Th1, levando ao dano articular progressivo (Choy e Panayi, 2001). Dentre estas citocinas, a mais estudada é o fator de necrose tumoral (TNF), que tem um papel dominante na fisiopatologia da AR. O TNF é um estimulador autócrino, além de ser um potente indutor parácrino de outras citocinas, incluindo Interleucinas (IL) 1, IL-6, IL-8 e fator estimulador de crescimento de colônia de granulócitos-monócitos (CSF-GM), também importantes na fisiopatologia da AR (Choy e Panayi, 2001).

Além da via Th1, a via Th17 desempenha um papel importante na progressão da AR. As células Th17 apresentam um papel significativo na inflamação humana autoimune, estimulada por componentes como Fator de Crescimento Tumoral beta (TGF-β), IL-6, IL-23, onde secretam IL-17 em algumas isoformas, IL-23 e outras (Bettelli *et al.*, 2006). Através de seus efeitos diretos ou indiretos em vários tipos de células, esta família de citocinas pode induzir resposta celular que cause inflamação, angiogênese, osteoclastogênese e destruição do osso e da cartilagem (Roeleveld e Koenders, 2015; Snelling *et al.*, 2017).

Vários estudos demonstram níveis elevados de IL-17 no sangue e na sinóvia de pacientes com AR, havendo correlação entre os níveis sinoviais aumentados e o dano articular (Ziolkowska *et al.*, 2000; Kirkham *et al.*, 2006). As citocinas da via Th17 (principalmente IL-17 e IL-23) estão relacionadas com a patogênese de várias doenças inflamatórias, incluindo a AR e a aterosclerose (Madhur *et al.*, 2010), comorbidade de alta incidência na AR (Kozera *et al.*, 2011).

O tratamento da AR é realizado primeiramente com anti-inflamatórios. O metotrexato é a droga padrão administrada (Lim *et al.*, 2014; Kumagai, 2015). Além do metotrexato, a Prednisona e a Leflunomida também são medicamentos de primeira escolha que apresentam bons resultados (Keen *et al.*, 2013; Ursini *et al.*, 2017). Em paralelo ao controle da inflamação local e sistêmica, a manutenção da pressão arterial deve ser criteriosa em pacientes portadores de AR para reduzir a frequência de eventos cardiovasculares.

Aproximadamente 50% das mortes prematuras nos pacientes com AR estão relacionadas à doenças cardiovasculares (DCV), fato esse explicado pela ação lesiva das alterações inflamatórias e imunológicas da AR na parede das artérias, levando ao aparecimento de aterosclerose precoce (Kozera *et al.*, 2011). Comparado com a população geral, pacientes com AR tem um risco duas vezes mais elevado de desenvolver DCV e risco de desenvolver infarto agudo do miocárdio (IAM) comparado a grupo controle, mesmo 10 anos mais velhos, sem o acometimento da AR (Lindhardsen *et al.*, 2011).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é reconhecida como o principal fator de risco cardiovascular (CV) modificável para pacientes com AR (Yusuf *et al.*, 2004). A sua prevalência em pacientes com AR é alta e possivelmente está relacionada a fatores genéticos, redução da atividade física ou ainda à própria doença (Chung *et al.*, 2012; Siebert *et al.*, 2016; Mahmoudi *et al.*, 2017). Deste modo, o diagnóstico correto e tratamento efetivo da HAS é de extrema importância para redução do risco CV na AR. Um estudo realizado em pacientes com AR sem DCV prévia conhecida demonstrou uma prevalência de HAS de 67%, sendo que destes, 10% desconheciam ser hipertensos e 29% apresentavam falta de controle dos níveis pressóricos (Protogerou *et al.*, 2013).

Evidências demonstram o papel da inflamação no desenvolvimento da HAS (Schiffrin, 2014). Mecanismos da imunidade inata, células T efetoras e regulatórias e ainda moléculas co-estimulatórias parecem estar envolvidos na etiopatogênese da HAS, interagindo em sua maior parte com o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), principal responsável pela regulação da pressão arterial e do balanço hídrico (Simões E Silva *et al.*, 2013). Foi demonstrado também que a Angiotensina II (Ang II) induz resposta Th17, aumentando 2 a 3 vezes o número destas células em camundongos com hipertensão induzida (Madhur *et al.*, 2010).

Pesquisas com aterosclerose (Liu *et al.*, 2014) e doença pulmonar (Liu *et al.*, 2012) demonstram que a utilização dos Bloqueadores do Receptor de Angiotensina (BRAs) podem ter um caráter imunomodulador diminuindo a expressão de NFκB (Mojiri-Forushani *et al.*,

2018), mas ainda não existem dados publicados se estes medicamentos possuem atividades imunomoduladoras em PBMCs de pacientes com AR.

Neste contexto, este trabalho avaliou os níveis das citocinas IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34. pouco conhecidas na AR, bem como efeito imunomodulador da Losartana e Valsartana como bloqueadores do receptor de angiotensina (BRAs), e do inibidor da enzima conversora de angiotensinogênio (ECA), Enalapril, em PBMCs provenientes de pacientes portadores de AR atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ARTRITE REUMATOIDE

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença crônica e sistêmica que acomete diferentes tecidos do corpo, como as articulações, tecidos conectivos, tendões e ossos. Ocorre geralmente na fase adulta do paciente, entre os 20 e 40 anos de idade, causando além de dor, erosões na estrutura óssea e cartilaginosa. Os sintomas da AR aparecem nas mulheres em idades mais jovens, por volta dos 30 anos, e nos homens possuem uma característica tardia, ou seja, acometendo por volta dos 40 anos (Goemaere *et al.*, 1990) e, consequentemente, os sintomas começam a progredir, caso não sejam tratados. As articulações são as principais áreas acometidas, levando a inflamação da sinóvia e, mais adiante, destruição óssea (Baan *et al.*, 2011).

A prevalência é de aproximadamente 1% da população mundial, sendo uma das doenças mais prevalentes dentre as doenças inflamatórias autoimunes (Haroon *et al.*, 2007; Smolen *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos há cerca de 1.29 milhões de pacientes diagnosticados com AR, com maior prevalência em mulheres, quase o dobro do acometimento em homens (Helmick *et al.*, 2008). Dados epidemiológicos da população americana apontam a incidência da AR muito maior nos grupos caucasianos (até 6,3%) em relação aos asiáticos (cerca de 0,3%), apontando um caráter genético envolvido (Gibofsky, 2012). Um trabalho nacional de 2004, aponta a incidência da AR no Brasil de cerca de 0,46%, ou seja, nessa época, esse valor alcançava quase 1 milhão de doentes diagnosticados com AR (Senna *et al.*, 2004).

Os sintomas da AR podem incluir fadiga, dores, rigidez articular e edemas localizados. Isso ocorre devido ao inchaço das articulações, sendo os locais mais acometidos pela AR, e em geral de forma simétrica (Aletaha *et al.*, 2010). Quando a inflamação se torna crônica, os danos ósseos começam a surgir, resultando na deformação da articulação por desgaste ósseo e danos causados a cartilagem (Aletaha *et al.*, 2010; Van Der Heijde *et al.*, 2013).

O diagnóstico precoce da AR traz ao paciente o benefício do tratamento mais rápido e evita a progressão acelerada dos danos que a doença pode causar. Os primeiros sintomas da AR podem passar despercebidos, mas o diagnóstico realizado de forma rápida e com o tratamento iniciado, o comprometimento articular e ósseo pode ser retardado ou até controlado (Hussain *et al.*, 2016). Para o diagnóstico, é necessário que seja analisado o exame clínico, os exames laboratoriais e radiológico do paciente (Toyota *et al.*, 2016).

2.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da AR é estabelecido através de um consenso do Colégio Americano de Reumatologia (ACR). No primeiro consenso de 1988 consta alguns critérios de avaliação e, posteriormente, ele foi reavaliado e atualizado em 2010 pelo ACR e pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) (Arnett *et al.*, 1988; Aletaha *et al.*, 2010). Os critérios para diagnóstico da AR definidos em 1988 e atualizado em 2010 podem ser vistos na **Tabela 1** e **Tabela 2** respectivamente.

Tabela 1: Critérios do Colégio Americano de Reumatologia 1988 para classificação da Artrite Reumatoide

Critérios	Definição
Rigidez Matinal	Rigidez matinal de pelo menos uma hora até melhora máxima
Artrite de três ou mais áreas articulares	Ao menos três áreas articulares simultaneamente afetadas, observada pelo médico (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos e metatarso falangeanas)
Artrite das articulações das mãos	Artrite em punhos ou metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais
Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo de áreas de ambos os lados do corpo
Nódulos Reumatoides	Nódulos subcutâneas sobre proeminências ósseas, superfícies extensoras ou em regiões justa-articulares
Fator reumatoide sérico positivo	Presença de quantidades anormais de fator reumatoide
Alterações radiográficas	Radiografia posteroanteriores de mãos e punhos demonstrando rarefação óssea justa-articular ou erosões

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a classificação da AR o paciente deveria fechar ao menos quatro dos sete critérios apresentados, e ainda presentes por, no mínimo, seis semanas.

Tabela 2: Classificatórios para a Artrite Reumatoide de 2010 do Colégio Americano de Reumatologia e Liga Europeia Contra o Reumatismo

Critérios	Definição	
População-alvo	Paciente com pelo menos uma sinovite clínica definida (edema)*. Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença. *Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota.	
Acometimento articular (0-5)	1 grande articulação	0
	2-10 grandes articulações	1
	1-3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2
	4-10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3
	>10 articulações (pelo menos uma pequena)	5
Sorologia (0-3)	FR negativo E ACPA negativo	0
	FR positivo OU ACPA positivo em baixos títulos	2
	FR positivo OU ACPA positivo em altos títulos	3
Duração dos sintomas	< 6 semanas	0
	≥ 6 semanas	1
Provas de atividade inflamatória	PCR normal E VSH normal	0
	PCR anormal OU VSH anormal	1

FR – Fator Reumatóide; ACPA – Anticorpos Antiproteína e Peptídeo Citrulinado; PCR – Proteína C Reativa; VSH – Velocidade de Hemossedimentação

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR seguindo os critérios EULAR (2010).

Para o avaliar a atividade da AR, achados clínicos e as características físicas são levados em consideração e podem ser mensurados pelo Índice Clínico da Atividade da Doença (CDAI – do inglês *Clinical Disease Activity Index*) e/ou o Índice de Atividade da Doença (DAS28) (do inglês Disease Activity Index) (Aletaha *et al.*, 2010).

O CDAI é uma simplificação do Índice Simples de Atividade da Doença (SDAI - do inglês *Simple Disease Activity Index*). Ele usa as avaliações clínicas e correlaciona-se bem com outros escores de atividade de doença e critérios de resposta, bem como com progressão de

dano articular e comprometimento funcional. O CDAI permite ainda que as decisões de tratamento imediato do paciente sejam inteiramente baseadas em critérios clínicos (Aletaha *et al.*, 2010). O cálculo do CDAI é feito pela soma das articulações inchadas, edemaciadas (sensíveis), a avaliação do paciente para o seu estar e a avaliação médica para o estado do paciente, em acordo com a seguinte equação:

CDAI = Contagem de Articulações Inchadas + Contagem de Articulações Sensíveis + Avaliação Global do Paciente da Atividade da Doença + Avaliação Global do Médico da Atividade da Doença do Paciente

Os resultados obtidos são classificados como:

≤ 2,8: Remissão

> 2,8 e ≤ 10: baixa atividade da doença

> 10 e ≤ 22: moderada atividade da doença

> 22: alta atividade da doença

O DAS28 é composto por 4 variáveis, sendo elas: (I) a velocidade de hemossedimentação (VSH), (II) o número de articulações dolorosas e (III) inflamadas e (IV) o grau de comprometimento causado pela doença, por meio de uma escala visual avaliada pelo paciente. Após a avaliação dos critérios o valor obtido do DAS28 classifica a AR do paciente em: baixa, moderada ou intensa atividade (Alemao *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016). Assim como no CDAI, no DAS28 o score é dado pela soma de alguns critérios, sendo eles a contagem das articulações inchadas, edemaciadas, avaliação do paciente e somado ao VSH.

DAS28 = Contagem de Articulações Inchadas + Contagem de Articulações Sensíveis + Avaliação Global do Paciente da Atividade da Doença + Velocidade de Hemossedimentação

Os resultados obtidos são classificados como:

≤ 2,6: Remissão

> 2,6 e ≤ 3,2: baixa atividade da doença

> 3,2 e ≤ 5,1: moderada atividade da doença

> 5,1: alta atividade da doença

Além do VSH e da avaliação dos parâmetros para a composição do DAS28, outras avaliações clínicas podem ser utilizadas em conjunto para o diagnóstico da AR.

O FR está relacionado com as doenças autoimunes, inclusive a AR, e é utilizado para o prognóstico, mas não é critério de acompanhamento da doença, mesmo estando relacionado

positivamente com cerca de 70% dos acometidos com AR (Othman *et al.*, 2016; Smolen *et al.*, 2016). É incluído também a dosagem dos anticorpos anti-peptídeos citrulinados clínicos (anti-CCP2) (Cuchacovich *et al.*, 2014) que se tornou indispensável para o prognóstico e diagnóstico precoce da AR (Aletaha *et al.*, 2010; Roos *et al.*, 2016).

É importante a utilização do raio-x para avaliar a erosão óssea da articulação acometida. É uma técnica relativamente barata e de primeira linha em comparação com outras técnicas mais robustas. Porém não é padrão ouro para identificar a AR inicial (Forslind *et al.*, 2012; Popescu *et al.*, 2015).

2.3 ETIOLOGIA

Diversos fatores são apontados como desencadeadores da AR. O caráter genético fica mais evidente quando foi apontada a relação da AR aparecendo em descendentes familiares e também em gêmeos univitelinos (Silman, 1994). O envolvimento genético na AR é um fator bastante estudado (Guo e Li, 2016) e observa-se associações do aparecimento da doença com o Antígeno Leucocitário Humano relacionados ao antígeno D (HLA-DR) (Fontecchio *et al.*, 2007).

O HLA-DR é um tipo de receptor de superfície do Complexo de Histocompatibilidade tipo II (MHCII), codificado pelo cromossomo 6 na região 6p21.31 (Dankers *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2016). O subtipo mais relacionado com a AR é o HLA-DRB1, de cadeia beta 1 (Kim *et al.*, 2016), os pacientes que carregam o alelo HLA-DRB1 estão mais susceptíveis a desenvolver doenças autoimunes, como a AR (Citera *et al.*, 2001). As células apresentadoras de antígeno (APC) que carregam o HLA-DRB1 em sua membrana passam a informação para as células Th e, consequentemente, essa informação faz com que estas células desenvolvam uma resposta imune contra o receptor apresentado (Di Sante *et al.*, 2015) caracterizando então a resposta imune contra a sinóvia e componentes articulares do paciente com AR.

Embora o HLA-DRB1 esteja diretamente envolvido com a AR, mais de vinte outros alelos também estão relacionados com a doença. O comprometimento genético é uma forte indicação do desenvolvimento da doença, porém ainda não é utilizado na clínica (Karlson *et al.*, 2010). Genes que regulam a atividade de linfócitos, como a proteína tirosina fosfatase (PTPN22) podem influenciar a reatividade dessas células acelerando a resposta imune na AR (Kochi, 2010). A PTPN22 aumenta a resposta pelas células T e funções efetoras de neutrófilos, agravando então o quadro inflamatório do paciente com AR (Bayley *et al.*, 2015).

Além da genética, fatores externos como tabagismo, consumo de carne vermelha, obesidade, poluição e baixos níveis de vitamina D (Deane *et al.*, 2017) também estão associados com a gravidade da AR. O tabagismo está intimamente relacionado com o agravamento da AR (Sundström *et al.*, 2015) e com seus marcadores clínicos, como é o caso do peptídeo citrulinado cíclico, o teste do anti-CCP2 (Goeldner *et al.*, 2011).

A patogênese da AR é resultante de um complexo de fatores, dentre eles genéticos e ambientais, induzindo uma ativação aberrante do Sistema Imune (SI) inato e adaptativo, o que leva a uma quebra da tolerância imunogênica, apresentação de auto antígenos e ativação específica de células T e B e produção desregulada de citocinas inflamatórias (Calabresi *et al.*, 2018). Essa cascata de eventos leva a uma proliferação da sinóvia e causa uma destruição da cartilagem e do osso subcondral. Pode ainda levar a envolvimentos extra-articulares, como ataque imunológico aos tecidos epiteliais, fígado, pulmão e, principalmente, sistema cardiovascular (Calabresi *et al.*, 2018).

Em concordância com os recentes artigos sobre os riscos da dieta como fatores de risco para o desenvolvimento da AR, foi observado que o consumo moderado de álcool e de uma alimentação com baixa ingestão de carnes vermelhas estão associados com uma queda do risco de desenvolvimento da AR (Hu *et al.*, 2017). Já o consumo de sódio, está envolvido com um aumento da inflamação, principalmente por induzir as células a produzirem fatores inflamatórios como TGF-β (Scrivo *et al.*, 2017). Ressalta-se que o sódio é um importante fator de risco também para o desenvolvimento da HAS (Kirabo, 2017; Mirmiran *et al.*, 2018; Murtaugh *et al.*, 2018).

Vários são os hormônios envolvidos ou associados nas doenças articulares inflamatórias, como a AR, o que sugere a interferência destes com o SI (Ostor e Mccoll, 2001; Kelley *et al.*, 2007). Como a AR afeta predominantemente as mulheres, os hormônios sexuais, como a prolactina e o estrogênio, têm sido considerados por muito tempo como importantes na patogênese da AR, a maioria com respostas pró-inflamatórias (Mcmurray, 2001; Orbach *et al.*, 2007; Costanza *et al.*, 2015).

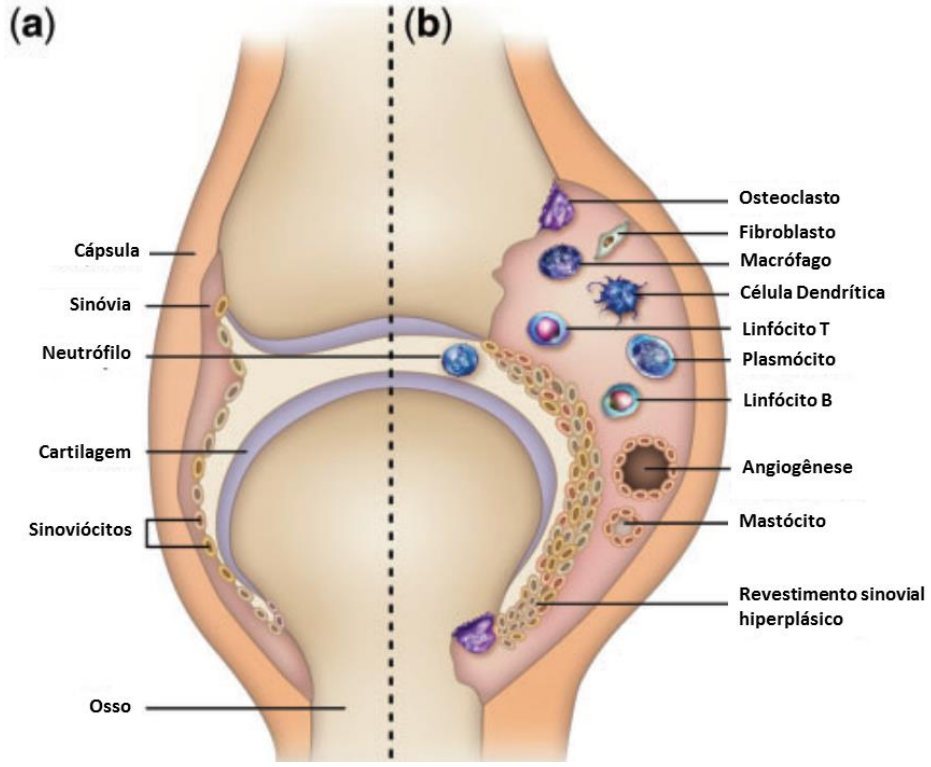
2.4 FISIOPATOLOGIA

A AR começa com a ativação de células do sistema imune e com a proliferação de sinoviócitos dentro das sinóvia acometida. O processo inicial está relacionado com glicoproteínas especificas que são reconhecidas por células T (Harris, 1996; Aletaha *et al.*, 2010). Como a AR é uma doença imunomediada, os linfócitos T e B passam a reconhecer o

tecido saudável como não próprio, particularmente nas articulações, porém ainda sem um motivo inicial esclarecido. É sabido que o foco da inflamação ocorre na sinóvia e esse ataque é mediado e intensificado pela resposta imune exacerbada no sítio de inflamação. Mediadores secretados por essas células são responsáveis por esse agravamento (Aletaha *et al.*, 2010).

A caracterização das células inflamatórias infiltrantes e seus produtos é de grande importância na compreensão da patogênese da AR (Lydyard e Edwards, 1994). Na AR, a estrutura original da sinóvia é destruída pela infiltração de linfócitos T CD4+ (grupamento de diferenciação 4, do inglês *cluster of differentation*), pela proliferação exacerbada dos sinoviócitos, deposição de proteínas de matriz extracelular e neovascularização (Rinaldi e Schwarz-Eywill, 1999; Prendergast *et al.*, 2018). A membrana da sinóvia do paciente com AR se torna hiperplásica, com um aumento nos sinoviócitos e outras células imunes e inflamatórias, como linfócitos T (T) e linfócitos B (B), células dendríticas e outras, como pode ser visto na Figura 1.

Figura 1 – Esquema ilustrativo da articulação saudável e com AR.



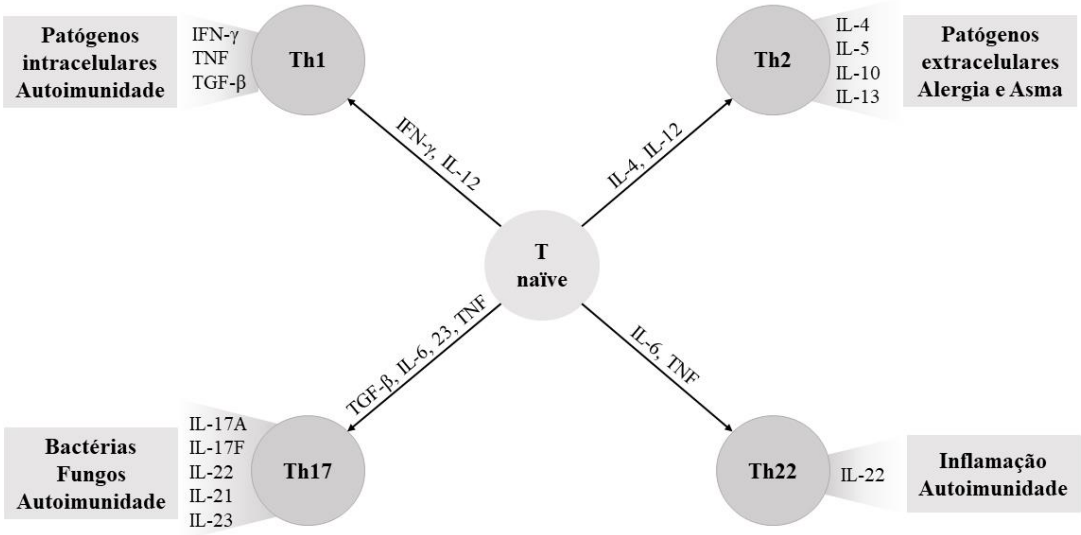
A figura mostra a comparação de uma articulação saudável (a) e uma acometida com AR (b) além as células e componentes inflamatórios alterados na doença. Em **a** não há alteração celular, infiltração ou desgaste ósseo, observa-se a homeostase. Na imagem **b** é possível notar um infiltrado celular com macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B recrutados e ativados pelas células dendríticas e mastócitos. Osteoclastos ativados e encarregados da escavação óssea. Revestimento sinovial em hiperplasia, ou seja, mais sinoviócitos ativos, e angiogênese ativa, favorecendo o transporte e migração celular.

Fonte: Retirado e Adaptado de Smolen e Steiner, (2003).

O primeiro momento do desenvolvimento da AR é caracterizado pela ativação da resposta imune inata com a indução das células dendríticas e as células apresentadoras de antígenos. Após isso, a resposta imune adaptativa é ativada com a atuação das células T (Smolen e Steiner, 2003; Smolen *et al.*, 2007) e, consequentemente, secreção de IL-2 e IFN-γ pelas T CD4+ (Smolen *et al.*, 2007). Este infiltrado leva a um aumento na produção de fatores inflamatórios e citocinas (Morović-Vergles, 2003). Inúmeras destas proteínas inflamatórias estão diretamente envolvidas com a gravidade da AR. O TNF, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-23/IL-17 são as citocinas mais envolvidas e estudadas até o momento (Picerno *et al.*, 2015) e cada vez mais as pesquisas se voltam para estes fatores inflamatórios na artrite reumatóide.

As células Th polarizadas, bem como as principais citocinas por elas produzidas podem ser vistas na **Figura 2**, bem como suas funções primordiais no organismo. É possível identificar que na AR temos um desbalanço imunomediado por células do tipo Th1, Th17 e Th22 (Zhang *et al.*, 2011) .

Figura 2: Célula T naïve e sua ativação em subtipos de células Th.



As células T naïve são estimuladas pelas citocinas estimulatórias de cada subpopulação e as citocinas secretadas por essas células estão relacionadas com suas implicações no sistema imune. A AR apresenta subpopulações aumentadas de células Th1, Th17 e Th22.

Fonte: Elaborada pelo Autor

As células T naïve são estimuladas na presença de citocinas como IFN-γ e IL-12 e tornam-se polarizadas para o subtipo Th1, atuando com uma resposta inflamatória e autoimune, principalmente na AR, ao produzirem e secretarem IFN-γ, TNF e TGF-β, potentes estimuladores inflamatórios (García *et al.*, 2001; Buccione *et al.*, 2018).

Em adição, a via Th17 é conhecida pelo seu alto poder inflamatório na AR e tem atuação direta em diversas doenças autoimunes (Patel e Kuchroo, 2015; Marwa *et al.*, 2017; Snelling *et al.*, 2017). As citocinas produzidas pela via Th17 são, principalmente, a IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21 e IL-23. O papel da IL-17A e F na AR é bem significativo, induzindo a inflamação local e sistêmica. A polarização das células Th em Th17 é induzida principalmente num ambiente com a presença de IL-6, TGF-β, IL-23 e TNF, como ocorre na sinóvia do paciente com AR (Awasthi e Kuchroo, 2009; Basso *et al.*, 2009). TNF, TGF-β e a IL-6 são as citocinas

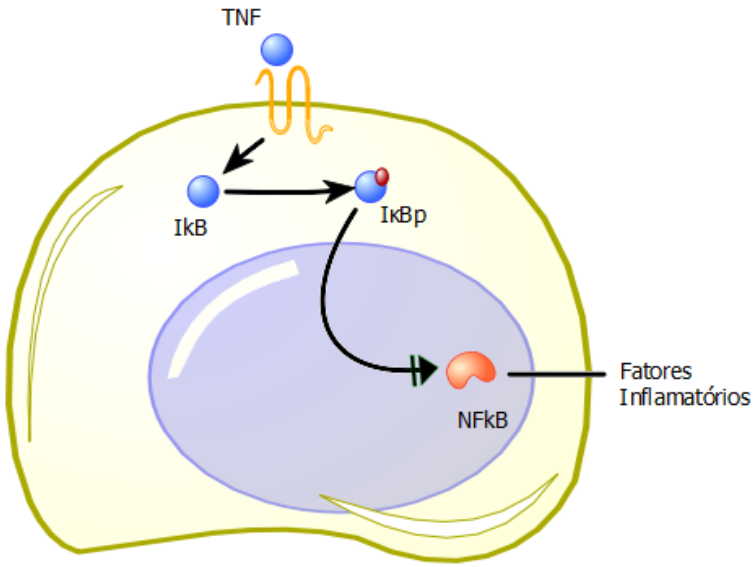
mais importantes nessa polarização. Uma vez que a célula T naïve não possua receptor para TGF-β, a polarização para a Th17 não irá ocorrer. O mesmo acontece com a IL-6, caso a célula não possua o IL-6R (Kim, 2009; Korn *et al.*, 2009; Patel e Kuchroo, 2015).

2.4.1 Citocinas Envolvidas na Fisiopatologia da AR

O TNF é uma importante citocina envolvida no desenvolvimento, progressão e agravamento da AR (Maini *et al.*, 1993) tanto que se tornou um dos principais alvos das terapias biológicas que utilizam bloqueadores de TNF (Harnett *et al.*, 2016). Ela é uma citocina chave para o recrutamento de outras células na sinóvia inflamada (Smolen *et al.*, 2007). O TNF está intimamente relacionado com efeitos locais na sinóvia dos pacientes com AR como ativação de células de defesa inata e adaptativa, produção de citocinas inflamatórias, diminuição da proliferação de fibroblastos sinoviais e também desencadeia efeitos sistêmicos, como a produção de proteínas de fase aguda, depressão, fadiga e doença cardiovascular (DCV) (Sattar *et al.*, 2003; Mcinnes e Schett, 2007).

Estudos *in vitro* tem demostrado que o bloqueio do TNF traz um caráter anti-inflamatório, uma vez que a supressão do TNF reflete na inibição da sinalização do NFκB (Huang *et al.*, 2012; Harnett *et al.*, 2016). Se por um lado, a IL-6 ligada ao seu receptor ativa a via JAK/STAT3 induzindo a produção de proteínas de fase aguda e a inflamação, o TNF irá agir ativando a via do NFκB (**Figura 3**) (Persad *et al.*, 2012). O NFκB atua como fator de transcrição para produção de fatores inflamatórios como Oxido Nítrico (NO) e citocinas, além de aumentar a proliferação celular. Quando inativo, encontra-se ligado a sua proteína inibitória IκB (Sen e Baltimore, 2006).

Figura 3 – Via de Ativação de Fatores Inflamatórios mediados pela ativação do TNFR a partir do TNF, desencadeia a fosforilação do NFκB.



Quando o TNF se liga ao TNFR, ativa a IκB, a qual é fosforilada, permitindo a ativação do NFκB que desencadeia no aumento da produção de fatores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, além de favorecer a polarização de células de defesa e sua ativação, como a ativação Th em Th1 ou Th17.

Fonte: Elaborada pelo Autor

Na AR, estudos demonstram que se há uma mutação ou variação na atividade do NFκB, pior será o quadro do paciente doente, apresentando uma clínica com atividade inflamatória exacerbada, ou seja, AR em alta atividade (Torices *et al.*, 2016) devido ao aumento deste fator (Müller-Ladner *et al.*, 2002). Foi observado ainda que a via TNF/NFκB provavelmente está relacionada com o desenvolvimento da aterogênese em pacientes com AR (Cuchacovich e Espinoza, 2009).

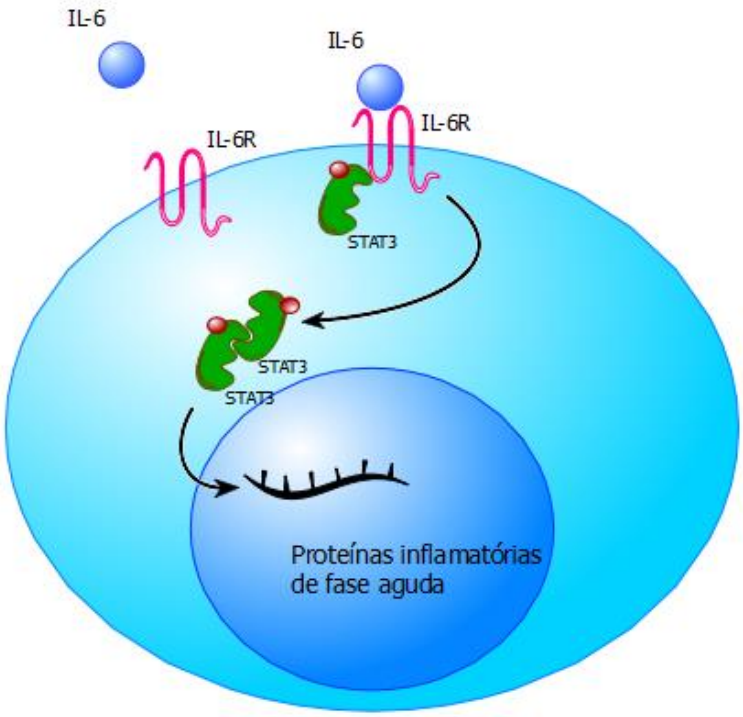
A IL-6 é uma das citocinas fundamentais no desenvolvimento da AR e correlacionada com a gravidade da patologia (Wei *et al.*, 2015). Ela tem uma característica especifica de atuar como sinalizadora para as células do infiltrado além de recrutar e ativar células que estão na circulação (Srirangan e Choy, 2010). Estudos com cultura de fibroblastos diferenciados em sinoviócitos e estimuladas com proteína quimiotática de monócitos (CCL)-2 e -5 mostraram que estas células foram capazes de aumentar sua produção de IL-6 e IL-8 e também os receptores correspondentes às CCLs (Nanki *et al.*, 2001) indicando que a IL-6 é produzida até por células presentes naturalmente na sinóvia.

É importante ressaltar que a IL-6 tem sua produção acentuada por monócitos CD14+ quando estes estão em cultura estimulada com TNF. Como o TNF não induz a produção da IL-

17 pelas T CD14+, ele aumenta o nível de fosforilação do fator de transcrição ativado por tirosina quinase 3 (STAT3) (Anderson *et al.*, 2016) e o fator de transcrição RORC, essenciais para a ativação das células Th17 (Zheng *et al.*, 2014).

Em cultura de sinoviócitos diferenciados a partir de fibroblastos, foi possível observar que com o bloqueio da STAT3 houve uma diminuição dos receptores tipo Toll (TLRs), o qual é um importante receptor ativador das Th17 (Lee, S. Y. *et al.*, 2014), diminuindo então a produção da IL-17 nessa cultura (Isomäki *et al.*, 2015). Um resumo da participação da IL-6 na ativação de transcrição de fatores inflamatórios pode ser visto na **Figura 4.**

Figura 4 – Ativação da STAT3 pelo complexo IL-6/IL-6R leva a um aumento de produção de proteínas inflamatórias de fase aguda.



A citocina IL-6 quando se liga ao receptor de IL-6 na membrana celular ativa uma série de sinais que fazem que a STAT3 se ligue no complexo proteína-receptor a partir da Janus quinase (JAK), e assim a STAT3 é fosforilada. Uma vez que a STAT3 está ativa, ela passa, no núcleo, informações de transcrição genética para a produção de proteínas inflamatórias.

Fonte: Elaborada pelo Autor

Um estudo com pacientes acometidos com a AR em tratamento com o anti-TNF Adalimumabe, metotrexato ou os dois em conjunto, foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de IL-6, além de outras citocinas como o próprio TNF, levando a uma melhora

do quadro do grupo testado, o que só comprova o fator de importância destas citocinas (Yue *et al.*, 2010). O tratamento usando bloqueador do receptor da IL-6 (Nishimoto, 2008) aponta resultados positivos na remissão da AR regulando os níveis do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK) e seu ligante (RANKL) e da osteoprotegerina, importante reguladora do RANK e RANKL, reduzindo então a atividade dos osteoclastos e o desgaste ósseo (Remuzgo-Martínez *et al.*, 2016); (Terpos *et al.*, 2011; Woodrick e Ruderman, 2012; Tanaka *et al.*, 2018).

Portanto, fica claro e evidente o papel primordial das citocinas IL-6 e TNF com as vias de ativação da inflamação. É possível observar que a AR está intimamente relacionada ao NFκB e a STAT3 e, consequentemente, as células Th17 são ativadas e recrutadas também por estes dois mediadores, contribuindo para a o infiltrado celular da sinóvia na AR e produção de outros mediadores inflamatórios (Nalbant e Eskier, 2016).

Outra citocina envolvida no desenvolvimento e progressão da AR é a IL-17, que está em níveis mais elevados na sinóvia do paciente (Kotake *et al.*, 1999), correlacionada com a destruição óssea, além de induzir produção de IL-6 pelas células T, como foi possível observar em co-culturas e em experimentos com camundongos tratados com IL-17 (Kotake *et al.*, 1999; Chabaud *et al.*, 2001).

A nível celular, estudos apontam a IL-17 como uma citocina com funções inflamatórias diversas, mas importantes na inflamação da sinóvia do paciente com AR, por exemplo, induzindo a angiogênese (Pickens *et al.*, 2010) e a migração de leucócitos para o local inflamado (Shahrara *et al.*, 2009) ou até mesmo a ativação de osteoclastos que atuam na degradação óssea (Moon *et al.*, 2012).

Deve-se falar da IL-17 como uma família de seis citocinas estruturalmente semelhantes (Amatya *et al.*, 2017), sendo a principal a IL-17A. Somando a IL-17A, outros subtipos de IL-17 também podem ser expressos pelas células Th17, como IL-17F (células Th-17 e células γδ T) (Chang e Dong, 2009) e IL-17C (células epiteliais) (Ramirez-Carrozzi *et al.*, 2011), esta última atuante principalmente em doenças inflamatórias das vias aéreas (Yamanaka *et al.*, 2018), patogênicas ou não, a depender do sítio aonde estão sendo expressas. Com esses achados, entende-se que a via Th17 pode ser patogênica dependente de IL-17A ou não, resultante do tipo de citocina que está sendo produzida no momento (Baeten e Kuchroo, 2013). As outras subunidades da IL-17 correspondem a IL-17B, IL-17D e IL-17E (Iwakura *et al.*, 2011).

Na patogênese da AR, tanto os fibroblastos sinoviais quanto as células T, participam na perpetuação da inflamação. Em co-culturas de linfócitos T com fibroblastos foi possível observar a produção de IL-6 e IL-8 pela indução da IL-17A, via ativação da via NFκB (Hwang *et al.*, 2004) o que acaba interligando todo o processo de inflamação IL-6/STAT3 e TNF/NFκB

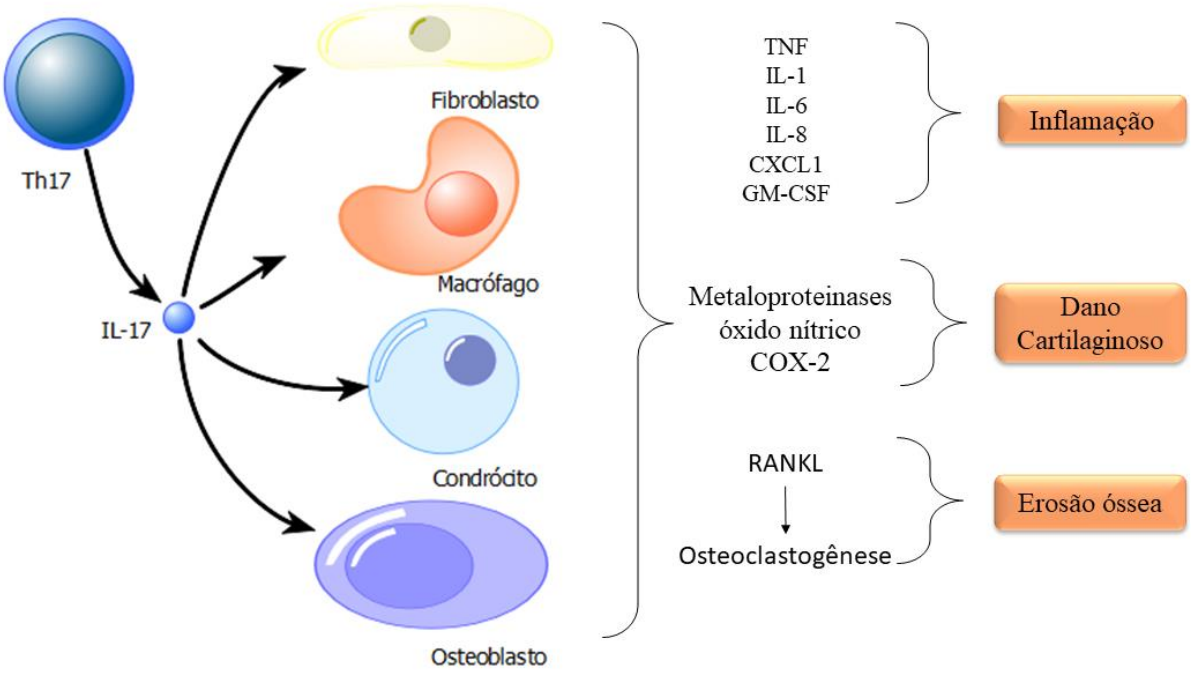
já explicado. A IL-17A se mostra atuante na AR e a partir dos anos 2000 teve enfoque de terapias biológicas com anticorpos monoclonais (Miossec, 2004).

A IL-17F é cerca de 50% similar a IL-17A, porém possui um caráter inflamatório um pouco reduzido quando atuante sozinha. Em sinergismo com a IL-17A e/ou o TNF ela se torna um potente indutor inflamatório, principalmente na AR (Miossec, 2017). Assim como a IL-17A, a IL-17F também é produzida pelas células T ativadas, induz a expressão de citocinas e quimiocinas e desempenha um papel na destruição do tecido esquelético e processos inflamatórios na AR. IL-17F induz ainda a liberação significativa de matriz de cartilagem e inibe a síntese de nova matriz de cartilagem (Hymowitz *et al.*, 2001).

Esta citocina induz um padrão de expressão similar a IL-17A na presença de TNF, no entanto, a expressão de IL-17F pode ser aumentada em relação a IL-17A (Zrioual *et al.*, 2009). A IL-17F regula ainda a angiogênese e a produção de IL-2, TNF e TGF-β em células endoteliais (Starnes *et al.*, 2001) e CXCL1, IL-6, IL-8 e G-CSF de células epiteliais, como estudado por experimentos *in vitro* (Kawaguchi *et al.*, 2003; Chang e Dong, 2009). Um estudo com um grupo polonês acometido com AR mostrou que uma variação genética de polimorfismo para a IL-17F (IL-17F His161Arg) está relacionado com a gravidade da doença, onde os pacientes que possuíam esse polimorfismo estavam em quadros ainda mais graves de diagnóstico que os pacientes que apresentavam a IL-17F regular (Paradowska-Gorycka *et al.*, 2010).

Uma vez produzida a IL-17 irá ativar diversas células, como fibroblastos, mastócitos, células T, condrócitos e osteoclastos. Os fibroblastos, macrófagos e células T secretam citocinas inflamatórias na sinóvia como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, CXCL1, GM-CSF, as quais aumentam o processo inflamatório. Além disso, as outras células também produzem mediadores de degradação óssea e cartilaginosa como metaloproteinases, óxido nítrico e COX-2. A soma destes fatores fazem com que os osteoclastos sejam ativados a partir do RANKL e aumentam a degradação (Itoh, 2015; Koenders e Van Den Berg, 2015). A **Figura 5** demonstra parte do papel da IL-17 na AR.

Figura 5 – Produção de IL-17 pelas células Th17 e ativação de outras células presentes na sinóvia da AR e seus produtos agravantes da doença.



A citocina IL-17A/F quando se liga ao receptor IL-17R ou IL-17RA na membrana celular de fibroblastos e macrófagos faz com que estas células produzam citocinas inflamatórias como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, CXCL1 e GM-CSF que leva ao aumento da inflamação local. Além disso, metaloproteinases, óxido nítrico, COX-2 e RANKL induzem o dano cartilaginoso e a degradação óssea.

Fonte: Elaborada pelo Autor

A IL-17A e F são produzidas principalmente pela via Th17, mas esta via não se restringe apenas a estas citocinas. A IL-22, por exemplo, também é expressa pela Th17 (e pela Th22) e também está relacionada com a inflamação na AR (Cho *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). No entanto, a IL-22 aparenta ter uma dualidade na sua função. Em alguns estudos apresenta como caráter inflamatório (Da Rocha, L. F., Jr. *et al.*, 2012a; Zhao *et al.*, 2013; Roeleveld e Koenders, 2015), mas em outros é suposto que sua função seja de reparo tecidual, o que deixa essa interleucina ainda mais intrigante sobre sua função na AR (Korn *et al.*, 2009; Da Rocha, L. F., Jr. *et al.*, 2012b).

Destaca-se que o subtipo Th22 é um subtipo diferente do Th17, onde estas células secretam IL-22, mas não IL-17, além de expressarem receptores do tipo receptor de quimiocinas CC tipo 4 (CCR4), CCR6 e CCR10, mas não expressarem receptores para IL-17, CD61

(marcadores para Th17), IFN-γ (marcador para Th1) ou IL-4 (marcador para Th2) (Azizi *et al.*, 2015).

Experimentos prévios com fibroblastos sinoviais de AR com IL-22R já demonstraram um aumento dos níveis de mRNA de RANKL de uma forma dose dependente e em co-culturas com monócitos pré-estimulados com IL-22, levando a diferenciação de monócitos em osteoclastos, ou seja, se a IL-22 pode induzir a osteoclastogênese por RANKL há um indicativo maior da sua ação inflamatória na AR (Kim *et al.*, 2012; Da Rocha Junior *et al.*, 2013). Além disso, a IL-22 aumenta a proliferação e quimiotaxia de monócitos, bem como recruta células dendríticas e células T de memória para o local inflamado (Xu *et al.*, 1996; Ikeuchi *et al.*, 2005). A produção de IL-22 pode ainda ser estimulada ou aumentada se no sítio da inflamação houver a presença da IL-23, comum em diversas patologias imunomediadas (Kreymborg *et al.*, 2007).

Altos níveis de IL-23 em pacientes com AR já foram demonstrados e correlacionados com os parâmetros clínicos da AR, como FR, anti-CCP e PCR, além do DAS28 (Abu Al Fadl *et al.*, 2013). Em cultura com fibroblastos sinoviais foi possível observar o aumento da expressão da IL-23 após estímulo com IL-1β via NFκB (Loubaki *et al.*, 2013).

Adicionalmente, a IL-23 induz a produção de IL-6 e IL-8 nas culturas testadas com fibroblastos (Liu *et al.*, 2007) mostrando que esta citocina também está relacionada com o agravamento da inflamação na AR, e ainda, interligada com as outras citocinas mencionadas, como IL-6 e IL-22.

Além das citocinas já descritas, novas interleucinas vem sendo alvo de pesquisas e suas associações com a AR, como é o caso da IL-18. A IL-18 é uma citocina inflamatória membro da família da IL-1 e está aumentada no LES (Favilli *et al.*, 2009), na Gota (Cavalcanti *et al.*, 2016), na sinóvia de pacientes com AR, e é um importante fator e indutor inflamatório.

Esta citocina aparenta estar envolvida no recrutamento de células de defesa e também promovendo a produção de GM-CSF e NO (Morel *et al.*, 2001; Volin e Koch, 2011). A ativação celular pela IL-18 culmina numa cascata de sinalização inflamatória com o produto final sendo a liberação do NFκB, fator qual quando ativo induz a produção de IL-1, IL-6, dentre outros mediadores inflamatórios (Campo *et al.*, 2012; Diomede *et al.*, 2017). Embora haja controvérsias relatadas ao efeito da IL-18 nos fibroblastos sinoviais, condrócitos e na osteoclastogênese, o efeito da IL-18 na AR é perpetuar a inflamação e induzir a erosão óssea e destruição da cartilagem, direta ou indiretamente. No que diz respeito aos níveis de expressão do IL-18R, as células T e macrófagos na sinóvia, ou no líquido sinovial, são os maiores alvos celulares da IL-18 (Xue *et al.*, 2009). Complementado, a IL-18 também induz a produção da

IL-16, uma outra citocina inflamatória recente com indícios de que faz parte da fisiopatologia da AR (Templin *et al.*, 2017).

A IL-16, também conhecida como fator quimiotático de linfócitos, aparenta ser produzida por células CD4+ e CD8+ (Laberge *et al.*, 1996; Laberge *et al.*, 1998; Yoshimoto *et al.*, 2000), promovendo o recrutamento de células imunes e ativação de cascatas inflamatórias, como foi observado sua correlação positiva em dermatite atópica (Laberge *et al.*, 1998), no câncer (Seegert *et al.*, 2001) e no LES (Xue *et al.*, 2009). A produção da IL-16 pode ainda ser estimulada pela IL-18 e intensificada pela IL-17 (Templin *et al.*, 2017) e é demostrada sua associação com a gravidade da AR, correlacionada com produção de metaloproteinases agravantes do dano cartilaginoso (Murota *et al.*, 2016).

Ainda na família da IL-1, existe uma outra citocina com caráter inflamatório que é a IL-33. Esta citocina está correlacionada com a gravidade da AR a partir do momento em que se liga ao receptor da IL-1 (IL-1R) induzindo a ativação de NFκB e MAPK. A IL-33 promove ainda a maturação e proliferação de células T dos subtipos Th1 e Th17 (Milovanovic *et al.*, 2012; Vocca *et al.*, 2015). Além disso a IL-33 está correlacionada com o aumento da produção de autoanticorpos, porém ainda não se pode confirmar como um marcador preditivo da resposta ao anti-TNF (Sellam *et al.*, 2016; Rivière *et al.*, 2018).

A IL-33 e os receptores nos quais ela se liga (receptores T1/ST2), mostraram-se participantes de uma estimulação parácrina de sinalização de fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos, induzindo uma hipertrofia e fibrose destas células cardíacas (Sanada *et al.*, 2007). Então esta citocina inflamatória pode ser um gatilho para doenças como LES (Yang *et al.*, 2011), com o dano hepático em pacientes com hepatite B e C (Wang, Cai, *et al.*, 2012; Wang, Zhao, *et al.*, 2012) e correlacionando com o comprometimento vascular em pacientes com esclerose sistêmica (Terras *et al.*, 2013).

Como o membro mais recentemente descrito da família da IL-1, a IL-33 estimula a produção de proteínas pró-inflamatórias mediadas por mastócitos, abrindo novas perspectivas para o tratamento de doenças inflamatórias - como a AR – visando esta proteína como alvo (Arend *et al.*, 2008).

Foi demonstrado que a IL-31 participa de importantes vias da inflamação crônica (Chai *et al.*, 2017; Saleem *et al.*, 2017), como no controle do processo imune tanto inato quanto adaptativo (Edukulla *et al.*, 2015). A IL-31 é produzida por células CD4+ Th2 e por mastócitos, e sua função é a ativação principalmente de fibroblastos e eosinófilos (Di Salvo *et al.*, 2018; Furue *et al.*, 2018). Esta citocina parece controlar um sinal de transdução que regula a via para produção de citocinas, controle da proliferação celular e remodelação de tecido (Davidi *et al.*,

2017). Esta proteína pertence a família da IL-6, a qual também inclui além da IL-6, a IL-11 e a IL-27, a oncostatin M e o fator inibidor de leucemia (LIF) (Stott *et al.*, 2013).

A IL-32 possivelmente possui um caráter multifuncional, atuando tanto como uma proteína anti-inflamatória, pró inflamatória e como um regulador endógeno da produção de citocinas e regulador de apoptose (Joosten *et al.*, 2006). Enquanto isso, a IL-34 vem sendo identificada como uma citocina inflamatória que induz a ativação e migração de macrófagos, e está relacionada com diversos fatores como Inflamação, angiogênese, adesão e migração de células imunes em diversas patologias (Clavel *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016).

2.5 TRATAMENTO DA AR

A AR é uma doença até então sem cura. O seu tratamento é focado em reduzir os efeitos inflamatórios, agressivos e progressivos que podem ocorrer. O tratamento da AR era dividido em fármaco anti-inflamatório e drogas modificadoras do curso da doença (DCMD) sintéticas. Com o avanço e o surgimento de novas drogas, atualmente, medicamentos biológicos também estão incorporados nas opções do tratamento da AR. Na atual terapêutica são utilizados fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, corticosteroides, drogas antirreumáticas modificadoras do curso da doença e drogas biológicas, estas últimas focadas principalmente em bloquear a ação de citocinas inflamatórias, como o TNF (Smolen *et al.*, 2007). Apesar do tratamento da AR evoluir constantemente, uma das principais causas da alta mortalidade na AR ainda são as DCV (Dougados, 2016).

É estimado que se gaste cerca de R$ 7.000,00 por paciente por ano no país (De Azevedo *et al.*, 2008) e este valor tende a aumentar com o uso das terapias biológicas, tendo alto impacto no orçamento do SUS, como mostrado em um trabalho que avaliou os gastos das terapias biológicas em pacientes portadores de psoríase (Riveros *et al.*, 2014). Só no estado do Paraná, um estudo mostrou que o custo das drogas biológicas para os pacientes com AR foi de R$3.403.195,59 durante apenas um mês (Wiens *et al.*, 2012). Estima-se que este valor acumule mais de 9 bilhões de reais até o ano de 2022 em todo o país (Tundia *et al.*, 2016).

O consenso e recomendação da Sociedade Brasileira de Reumatologia sugere que o tratamento da AR seja direcionado da seguinte forma: 1) A decisão terapêutica deve ser compartilhada com o paciente; 2) imediatamente após o diagnóstico, uma DMCD deve ser prescrita e o tratamento ajustado para atingir remissão; 3) o tratamento deverá ser conduzido por reumatologistas; 4) o tratamento inicial inclui DMCD sintéticas; 5) o metotrexato é a droga padrão; 6) pacientes que não alcançaram resposta após a utilização de dois esquemas de DMCD

sintéticas devem ser avaliados para DMCD biológicas; 7) excepcionalmente, DMCD biológicas poderão ser consideradas mais precocemente; 8) recomenda-se preferencialmente o uso de agentes anti-TNF como terapia biológica inicial; 9) após falha terapêutica a uma primeira DMCD biológica, outros biológicos poderão ser utilizados; 10) ciclofosfamida e azatioprina podem ser consideradas em manifestações extra-articulares graves; 11) recomenda-se a utilização de corticoide oral em baixas doses e por curtos períodos; 12) os anti-inflamatórios não hormonais devem sempre ser prescritos em associação à DMCD; 13) avaliações clínicas devem ser mensais no início do tratamento; 14) terapia física, reabilitação e terapia ocupacional são indicadas; 15) deve-se recomendar tratamento cirúrgico para correção de sequelas; 16) métodos de terapia alternativa não substituem a terapia tradicional; 17) deve-se orientar planejamento familiar; 18) orienta-se a busca ativa e o manejo de comorbidades; 19) atualizar e documentar a vacinação do paciente; 20) doenças transmissíveis endêmico-epidêmicas devem ser investigadas e tratadas (Da Mota *et al.*, 2012).

A estratégia para o tratamento da AR conseguiu bons resultados com a utilização do Metotrexato (MTX) como droga padrão. Este medicamento não só suprime a inflamação, como é capaz de induzir a sua remissão da doença. O MTX é uma das drogas mais utilizadas no tratamento da AR (Durand, 2009). Estudos mostram que o MTX está associado positivamente com controle da atividade e progressão do dano dos pacientes com AR (Landewé *et al.*, 2002; Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2016).

A Prednisona (Pred) é um outro medicamento imunossupressor de uso clínico na AR e outras doenças reumáticas. Por meio de um receptor citoplasmático de glicocorticoide a Pred atinge o citoplasma e é carregada ao núcleo, e esse complexo liga-se em pontos específicos do DNA, modulando a transcrição de vários genes, inibindo expressão de mediadores inflamatórios (Krasselt e Baerwald, 2016).

A utilização da Pred em baixa dose garante seu efeito anti-inflamatório e boa resposta na maioria dos pacientes, tornando-a um dos medicamentos de escolha para o início do tratamento da AR (Lim e Conn, 2001). Porém, como efeito adverso, a Pred está associada a um aumento da homocisteína circulante em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico que fazem o uso desta droga, sendo um fator de risco para DCV (Boucelma *et al.*, 2011; Sabio *et al.*, 2014; Sabio *et al.*, 2016), e os mesmos efeitos adversos podem ser observados nos pacientes com AR.

Como a AR é uma doença inflamatória crônica em que a sinovite leva a degradação óssea, as citocinas inflamatórias como TNF são fatores chaves nesse processo, assim, o controle específico dessas proteínas com bloqueadores é uma potencial forma de tratamento (Miossec, 1997; 2004; 2017).

Estão disponíveis os medicamentos biológicos bloqueadores de proteínas específicas como o anti-TNF e anti-IL-6 (Kumagai, 2015) para o tratamento da AR, embora o desenvolvimento dessas novas drogas leve bastante tempo. Foram 20 anos de pesquisa desde a descoberta da IL-17 até o lançamento do primeiro bloqueador de IL-17 no mercado, em 2015, porém ainda sem aprovação pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) para tratar a AR no Brasil (Miossec, 2017). De acordo com a Novartis®, em 2018 as vendas deste medicamento devem alcançar cerca de U$ 5 bilhões de dólares.

A terapia biológica surgiu como alternativa para a AR por volta da década de 90 (Cush e Kavanaugh, 1995; Strand *et al.*, 1996) e segue em uso até os dias atuais com boas respostas terapêuticas pelos pacientes que a fazem (Kumagai, 2015). As terapias biológicas se estendem a: citocinas recombinantes; anticorpos monoclonais humanizados ou quiméricos anti citocinas inflamatórias; anticorpos monoclonais contra proteínas de superfície de linfócitos (Bulpitt, 1999; Azevedo *et al.*, 2015; Byng-Maddick e Ehrenstein, 2015). Por fim, foi possível observar que diferentes tipos de medicamentos atuam distintamente nas células do sistema imune, implicando que no futuro o tratamento poderá ser especifico para cada paciente, a partir de uma imunofenotipagem, descrevendo o tipo celular mais atuante no acometido (Nakayamada *et al.*, 2018). Após o início do tratamento com terapias biológicas, especificamente as anti-TNF, é possível observar uma melhora no índice de qualidade de vida dos pacientes acometidos com AR em cerca de três meses (Azevedo *et al.*, 2015).

Embora o tratamento da AR com terapia biológica anti-IL-17A seja utilizado em outros países, no Brasil o Secukinumabe (Cosentyx®) é disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para o tratamento de outras doenças como Espondilite e Artrite Psoriásica. A **Tabela 3** apresenta as principais terapias utilizadas para o tratamento da AR e seus alvos terapêuticos.

Tabela 3 – Terapias utilizadas no tratamento da AR, seus alvos terapêuticos e a disponibilidade no Sistema Único de Saúde.

Medicamento	Classe	Alvo Terapêutico	SUS	Ref.
Ibuprofeno	AINES	COX-1 e 2	Sim	(Schiff e Peura, 2012)
Prednisona	Corticosteroide	Alteração no DNA	Sim	(Krasselt e Baerwald, 2016; Ursini *et al.*, 2017)
Metotrexato	Antimetabólitto	Diidrofolato redutase	Sim	(Tornero-Molina *et al.*, 2017)
Sulfasalazida	Antimicrobiano	-	Sim	(Lee *et al.*, 2010)
Leflunomida	Antirreumático	Diidroorotato desidrogenase	Sim*	(Keen *et al.*, 2013)
Abatacepte	Inibidor da Co-estimulação de linfócitos T	CD80/86	Sim	(Pascart *et al.*, 2017)
Adalimumabe	Anti-TNF	TNF	Sim	(Dos Santos *et al.*, 2016)
Certolizumabe pegol	Anti-TNF	TNF	Sim	(Ruiz Garcia *et al.*, 2017)
Etanercepte	Anti-TNF	TNF	Sim	(Dos Santos *et al.*, 2016)
Golimumabe	Anti-TNF	TNF	Sim	(Vastesaeger *et al.*, 2016)
Infliximabe	Anti-TNF	TNF	Sim	(Doubrawa *et al.*, 2012)
Rituximabe	Anti-CD20	CD20	Sim	(Bredemeier *et al.*, 2014)
Tocilizumabe	Anti-IL-6R	IL-6R	Sim	(Scott, 2017)

*Não disponibiliza a dose de 100mg

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais; SUS – Sistema Único de Saúde; Ref. - Referência

De acordo com as recomendações da EULAR, o tratamento da AR deve ser logo iniciado com uma droga modificadora do curso da doença após o seu diagnóstico, como o Metotrexato em associação com uma baixa dose de corticosteroide. Contudo, se o acometido estiver em alta atividade da doença e não responder ao tratamento convencional, é recomendado que seja iniciada a utilização de drogas biológicas, as quais possuem maior poder terapêutico (Smolen *et al.*, 2016).

Embora na maioria dos casos os pacientes respondam bem às drogas de tratamento, há certas limitações que podem surgir. Pneumonia, tuberculose e predisposição para infecções virais, como por exemplo, hepatite B, C, herpes zoster e entre outros efeitos adversos já foram observados em pacientes sob tratamento de drogas de primeira linha da AR, como metotrexato (Koike, 2015). Por outro lado, já foi relatado que pacientes sob uso de drogas biológicas bloqueadoras de TNF possuem maior risco de desenvolver infecções latentes e até tumores (Ramiro *et al.*, 2014; Ramiro *et al.*, 2017). Até mesmo os medicamentos mais simples, como os corticosteroides possuem efeitos adversos relatados e são prescritos por um curto período de tratamento (Ethgen *et al.*, 2013).

2.6 COMORBIDADES

Como a AR é uma doença crônica, incapacitante e autoimune, ela pode afetar diretamente o paciente na sua qualidade de vida. Há evidências de comorbidades associadas a AR como problemas cardiovasculares, infecções ou até mesmo depressão e úlceras gastrointestinais. É comum o paciente com AR ter ao menos duas comorbidades (Michaud e Wolfe, 2007). As comorbidades nos pacientes com AR são prejudiciais e limitantes no tratamento primário da doença. Com isso, a qualidade de vida dos pacientes é reduzida, além de levar a uma piora no quadro grave da AR.

Osteoporose, depressão e fadiga são exemplos de comorbidades que não afetam diretamente na mortalidade destes pacientes, mas sim na sua qualidade de vida (Pukšić e Morović-Vergles, 2014). Além destas, é apontado que mesmo com a variação populacional em diversos países, ainda assim, as doenças cardiovasculares são as principais comorbidades encontradas em pacientes com AR (Dougados *et al.*, 2014).

2.7 DOENÇAS CARDIOVASCULARES COMO COMORBIDADES MAIS FREQUENTES NA AR

Estudos apontam a intima relação da AR com as doenças cardiovasculares, sendo um fator importante no desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Turiel *et al.*, 2010; Shenavar Masooleh *et al.*, 2016). Mesmo em pacientes acometidos com AR assintomática, existem danos relatados como fibrose do miocárdio e da parede dos vasos (Ntusi *et al.*, 2018). Várias interleucinas que estão presentes na sinóvia de pacientes com AR também são encontradas em maiores concentrações no soro em pacientes com DCV, como é o caso da IL-6 e da IL-1β (Ferraccioli *et al.*, 2010), TNF (Gonzalez-Gay *et al.*, 2006) e também da IL-17 (Li *et al.*, 2013).

Dentre as DCV, a de maior prevalência em pacientes acometidos com AR é a HAS, variando de 53%-73%. Em respeito à população geral, esse índice não passa de 20%, indicando uma comorbidade muito frequente em pacientes com AR (Panoulas *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2008; Kitas e Gabriel, 2011). É observado que a taxa de mortalidade dos pacientes com AR que tem DCV chega a quase 30% (Pereira *et al.*, 2012).

No Brasil, a incidência de infarto agudo do miocárdio é semelhante aos países desenvolvidos, como França, Canadá, Suécia e Estados Unidos. Este valor atinge até 3,5% dos pacientes com AR (Nobre e Gomes, 2015), o que demonstra a necessidade de tratar a AR e a DCV em conjunto.

Foi observado que na AR são mais frequentemente encontradas placas ateroscleróticas que em controles saudáveis e isso possui um link direto com a HAS. Além disso, a PCR altamente sensível está aumentada em pacientes com AR (Popkova *et al.*, 2007), marcador utilizado para avaliar risco cardiovascular em maiores níveis séricos.

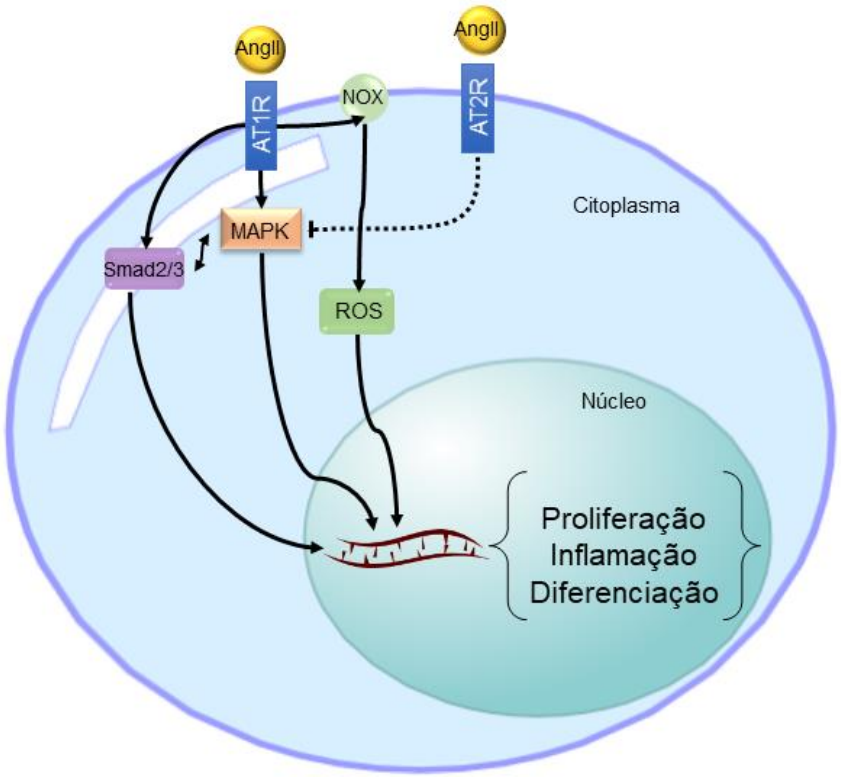
Há um consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia no tratamento das comorbidades em pacientes acometidos com AR. Em relação a HAS, o tratamento da AR deve ser feito com os inibidores da enzima conversora da angiotensina ou com bloqueadores do receptor da angiotensina II, preferencialmente (Pereira *et al.*, 2012), ou seja, o tratamento da HAS é feito pelo ajuste do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Em consonância, o consenso internacional também indica que pacientes acometidos com HAS devem utilizar para tratamento BRAs e em segunda escolha, os medicamentos inibidores da ECA (Committee, 2003).

Praticamente todos os componentes do SRAA estão presentes nas diversas células do corpo, inclusive células T, o que não era pensado anteriormente. Então o envolvimento do SRAA pode atuar diretamente na imunomodulação dos linfócitos como uma resposta anti-

inflamatória. Os receptores AT1 (da família dos receptores de membrana acoplados a proteína G) também estão presentes nas células mononucleadas, agindo na presença de medicamentos anti-hipertensivos (Te Riet *et al.*, 2015; Crowley e Rudemiller, 2017).

Vários estudos demonstram que o SRAA tem papel relevante na patogênese da inflamação, sendo o efeito da angiotensina II (Ang II), o principal responsável pelas ações pró-inflamatórias. A Ang II ativa várias funções celulares e vias de sinalização moleculares relacionadas com dano, inflamação e fibrose, incluindo mobilização de cálcio, geração de radicais livres, ativação de proteinoquinases e fatores de transcrição nucleares, recrutamento de células inflamatórias, adesão de monócitos e neutrófilos às células endoteliais e mesangiais, regulação de moléculas de adesão e estímulo da expressão, síntese e liberação de citocinas e quimiocinas (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2010; Sukumaran *et al.*, 2011; Capettini *et al.*, 2012; Sukumaran *et al.*, 2012; Te Riet *et al.*, 2015). A **Figura 6** resume algumas vias ativadas pela Ang II e seus mediadores inflamatórios.

Figura 6: Efeitos da Ang II através dos receptores AT1 e AT2.



A ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) após a estimulação do receptor AT1 regula a transcrição de genes alvo como metaloproteinases de matriz, inibidor de ativação do plasminogênio-1 que resulta em proliferação, produção de matriz extracelular/fibrose, diferenciação celular e inflamação. A estimulação do receptor AT1 aumenta ainda a NOX e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que também regula a transcrição de inflamatórios. A estimulação do receptor AT2 inibe a via MAPK.
Fonte: Elaborada pelo Autor

Foi demonstrado que há um desequilíbrio entre citocinas das vias Th1 e Th2, com aumento dos níveis de interferon gama (IFN-γ) e redução dos níveis de IL-4, quando é realizada a infusão de Ang II em ratos hipertensos com lesão renal, e que a administração de olmesartan, um bloqueador do receptor de Ang II corrigia esse desequilíbrio (Shao *et al.*, 2003). Foi demonstrado também que a Ang II ativa e promove a regulação dos genes NFκB *in vivo* e *in vitro* (Ruiz-Ortega *et al.*, 2000). Diversos trabalhos favorecem que a Ang II poderia contribuir para a patogênese da AR devido a presença de receptores AT1 em sinoviócitos de pacientes com AR (Walsh *et al.*, 1994).

Apesar destes achados, o papel preciso do SRAA em outras células não é bem elucidado. A infusão de Ang II em modelos experimentais de artrite *in vivo* foi capaz de induzir nos animais a hipertensão, disfunção endotelial e hipertrofia vascular. A expressão de AT1 e do receptor da ECA aumentaram expressivamente nas células endoteliais da aorta dos animais testados (Sakuta *et al.*, 2010). Muitas destas ações da Ang II são mediadas pelo seu receptor AT1 (e não AT2) e tem sido sugerido que o bloqueio destes receptores poderia ser útil para o tratamento das doenças inflamatórias (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2006; Benicky *et al.*, 2009; Kon *et al.*, 2011; Capettini *et al.*, 2012).

Em modelos experimentais de artrite, o tratamento com losartana reduziu o recrutamento de neutrófilos, a produção de TNF, IL-8 e quimiocina ligante-1. A análise histopatológica demonstrou redução significativa do dano tissular, da inflamação e redução da perda dos proteoglicanos. Em adição, a losartana reduziu diretamente o rolamento e adesão de leucócitos. O efeito anti-inflamatório da losartana pode também ser observado na melhora funcional articular dos animais estudados, por redução da nocicepção articular (Silveira *et al.*, 2013; Wylie-Sears *et al.*, 2014).

2.8 MEDICAMENTOS ANTAGONISTAS DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

2.8.1 Enalapril

O Enalapril, ou Melato de Enalapril, seu princípio ativo, foi inserido no tratamento da HAS com estudos iniciais na década de 80. Já era observado seu potencial como inibidor da ECA e manutenção da pressão arterial sistêmica (PAS), nos limites considerados normais, por até 12h no paciente (Ferguson *et al.*, 1982). Além disso, testes de estabilidade apontam uma boa estabilidade deste medicamento, sem grandes variações, o que faz ser tolerado por mais pacientes que fazem o uso (Loscertales *et al.*, 2015). Um estudo com Enalapril e modelo pré-clínico de nefropatia diabética apontou sua capacidade de diminuir a albuminúria, intimamente relacionada com a perda de leucócitos e células T, além de modular a polarização de macrófagos e promover expansão das T CD4+ e T CD8+ (Cucak *et al.*, 2015).

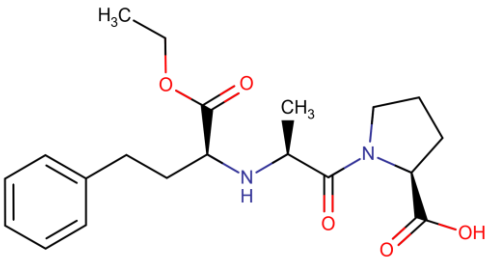
Um trabalho com esplenócitos de BALB/c, foi possível observar o potencial redutor do Enalapril em citocinas como a IL-2 e IL-10, além de correlacionar com o aumento do número de células T CD4+ CD103+ CD25-, ou seja, células T regulatórias negativas, assim células não secretoras destas citocinas (Albuquerque *et al.*, 2010). Outro estudo com ratos tratados com

Enalapril, observou-se que este foi capaz de reduzir os níveis de citocinas inflamatórias IL-1 e IL-6 tanto a nível proteico como a nível de expressão gênica (Wang *et al.*, 2010).

Em estudo com modelo animal de câncer pancreático, foi observado também que o enalapril foi capaz de reduzir toda a expressão do fator de transcrição NFκB, além do efeito antiproliferativo nas células neoplásicas (Fendrich *et al.*, 2014) e o mesmo efeito pôde ser observado em modelo experimental de colite. O enalapril não só reduziu a expressão do NFκB como atenuou também a ativação de macrófagos, diminuindo consideravelmente a inflamação da colite murina (Lee, C. *et al.*, 2014).

Embora seja possível ter um embasamento sobre os efeitos do Enalapril sob o sistema imune, este ainda permanece não esclarecido. Ainda são necessários trabalhos que comprovem a atuação deste composto na modulação das células inflamatórias e quais benefícios seriam evidenciados no tratamento em conjunto da AR. A estrutura química do Enalapril (C20H28N2O5) pode ser visualizada na **Figura 7** (DrugBank®).

Figura 7 – Estrutura química do Enalapril.



Fonte: DrugBank®

2.8.2 Losartana

A Losartana é um antagonista do receptor do tipo I da angiotensina II. A losartana inibe competitivamente a ligação da angiotensina II pelos receptores AT1 em muitos tecidos, incluindo o músculo liso vascular e as glândulas suprarrenais (Mizuno *et al.*, 1992; Derosa *et al.*, 2011). Este medicamento é metabolizado no seu metabolito ativo, o E-3174, que é 10 a 40 vezes mais potente (Sica *et al.*, 2005). A inibição da ligação da angiotensina II a AT1 inibe os seus efeitos vasoconstritores e secretores de aldosterona mediados por AT1 e resulta em diminuição da resistência vascular e da pressão sanguínea (Derosa *et al.*, 2011). A Losartana é

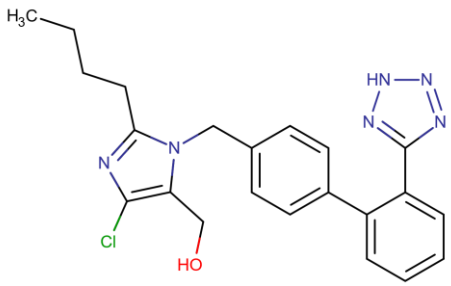
1.000 vezes mais seletiva para AT1 do que para AT2 (Sica *et al.*, 2005), sendo um medicamento muito eficaz para a redução da pressão arterial.

Os estudos com a Losartana começaram já na década de 90 e sua principal função era a redução da PAS pelo bloqueio do receptor da angiotensina (Weber, 1992) e logo foi apontada sua boa tolerabilidade e aceitação pelos pacientes cardíacos (Toth, 2003). Além da sua atuação primária como bloqueador de receptor de angiotensina II, a Losartana também pode se ligar a outro receptor, o receptor de tromboxano A2 (Ferrario, 2004).

Uma das causas de aumento de mortalidade na AR é quando um paciente doente tem como comorbidade a DCV. Alguns estudos demonstraram que os antagonistas AT1 do receptor da angiotensina II têm propriedades anti-inflamatórias. A Losartana pode atuar como um componente imunomodulador impedindo o desenvolvimento de monócitos pro-inflamatórios CD14 + CD16 + em pacientes em hemodiálise (Merino *et al.*, 2012).

Em modelos experimentais de glomerulonefrite, Ang II tem um efeito pró-inflamatório característico, aumentando a produção local de IFN-γ e TNF (Guo *et al.*, 2008). Além disso, a Agn II também está relacionada com várias respostas de monócitos e macrófagos, como quimiotaxia, adesão, recrutamento e aumento da fagocitose, importantes fatores que levam ao aumento da inflamação (Kim *et al.*, 1996). Estes estudos só apontam a importância da Ang II na modulação da inflamação e a Losartana como um medicamento BRA atuaria diretamente nos processos inflamatórios por ela envolvidos. A estrutura química da Losartana (C22H23ClN6O) pode ser visualizada na **Figura 8** (DrugBank®).

Figura 8 – Estrutura química da Losartana.



Fonte: DrugBank®

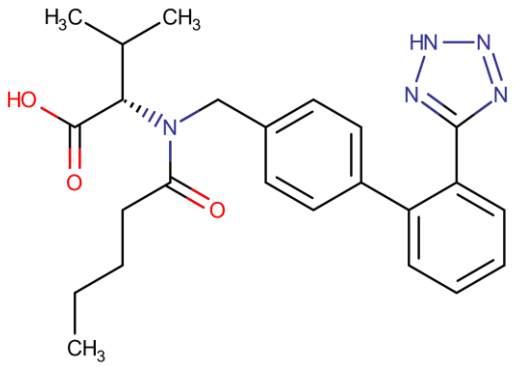
2.8.3 Valsartana

Assim como a Losartana, a Valsartana também é um BRA (De Gasparo e Whitebread, 1995), ou seja, bloqueador da Ang II e possível redutor dos efeitos pró-inflamatórios que esta pode causar (Meng *et al.*, 2015; Li, X. *et al.*, 2016). Em um estudo com camundongos com DCV induzida em uso prolongado da Valsartana, foi possível constatar que os efeitos da DCV foram reduzidos, mas também observada uma modulação na polarização das células T CD4+ em Th1 e Th17, diminuindo estas células, além de um aumento na polarização do subtipo Th2 e células Treg (Meng *et al.*, 2015), demonstrando um possível potencial da Valsartana influenciando respostas imunes via bloqueio da Ang II.

Já mais recente, foi observado em outro trabalho com camundongos que a Valsartana pode atuar também reduzindo a polarização e atenuação das Th1, reduzindo também o IFN-γ, citocina chave em diversos processos inflamatórios, incluindo a AR (Li, X. *et al.*, 2016).

Além disso, outros estudos apontam a capacidade da Valsartana atuar como um imunomodulador quando verificou que ela pode suprimir a resposta inflamatória de macrófagos (Iwashita *et al.*, 2013), reduzir os níveis de TNF e do estresse oxidativo via inibição do fator de transcrição NFκB (Iwashita *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013), interligando todo o processo inflamatório discutido. A estrutura química da Valsartana (C24H29N5O3) pode ser visualizada na **Figura 9** (DrugBank®).

Figura 9 – Estrutura química da Valsartana.



Fonte: DrugBank®

Embora alguns trabalhos apontem os possíveis efeitos anti-inflamatórios promovidos pelo Enalapril e pela Losartana e Valsartana, pouco ainda se sabe dessa modulação para com as doenças autoimunes, ainda mais a AR que possui uma estreita relação com as DCVs. Faz-se necessário estudos que mostrem caráter imunomodulador do Enalapril, Losartana e Valsartana em PBMCs de pacientes com AR, o que poderá ser um critério de escolha do medicamento anti-hipertensivo que deverá ser utilizado para o tratamento das DCV nestes pacientes.

3 **OBJETIVOS**

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar *in vitro* a atividade imunomoduladora do enalapril, losartana e valsartana, bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, em PBMCs provenientes de pacientes portadores de Artrite Reumatóide

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização dos voluntários quanto as características clínicas e laboratoriais

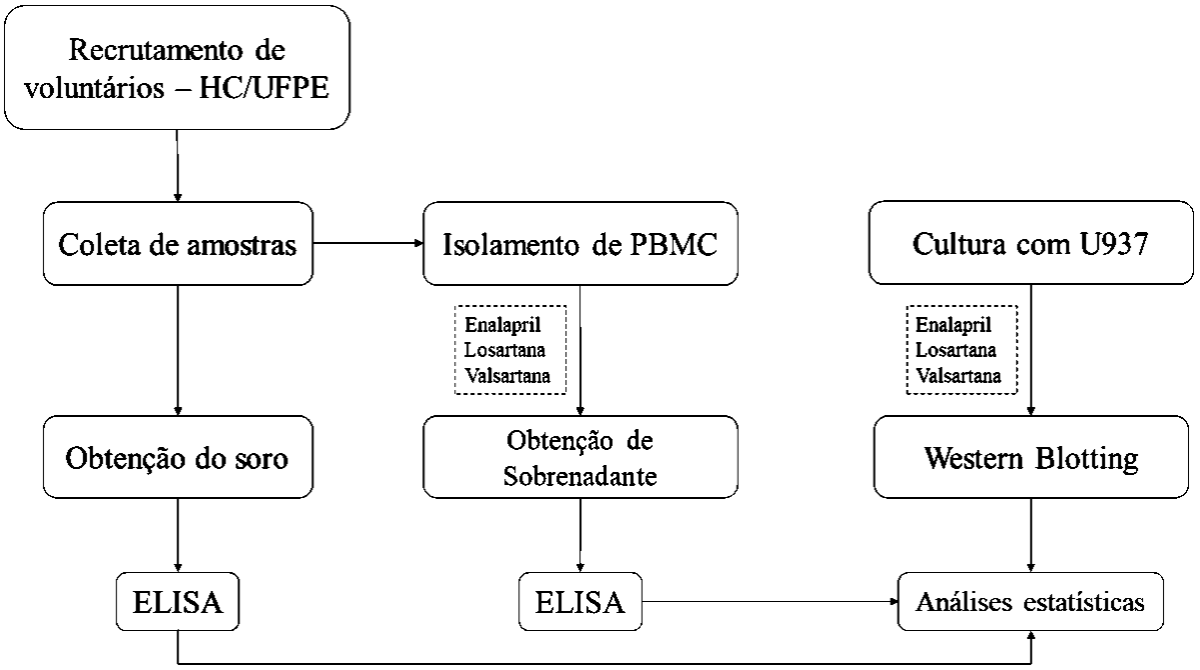
- Dosar os níveis séricos de IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 em pacientes acometidos com AR e em controles saudáveis e correlacionar com os dados clínicos e laboratoriais

- Avaliar o efeito *in vitro* do enalapril, losartana e valsartana na produção das citocinas IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-33 e TNF em PBMCs provenientes de pacientes portadores de AR e correlacionar com os dados clínicos e laboratoriais

- Quantificar o efeito *in vitro* do enalapril, losartana e valsartana sobre a inibição do fator de transcrição NFκB em células U937

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO



4.2 TIPO E LOCAL DE ESTUDO

Trata-se de um estudo exploratório, analítico, intervencional do tipo experimental, realizado no Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica Suely Galdino – NUPIT SG, em parceria com o Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3 RECRUTAMENTO DE VOLUNTÁRIOS

A avaliação clínica e convite de participação dos voluntários, além da coleta de material biológico, foram realizadas no ambulatório de artrite reumatoide do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE sob coordenação da Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte. A amostra final do trabalho foi composta por 140 indivíduos com AR e 40 indivíduos controles saudáveis. Os indivíduos foram selecionados randomicamente de acordo com o atendimento do ambulatório, durante o período do estudo, através dos critérios de inclusão e exclusão.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

4.4.1 Critérios de inclusão

Como critérios de inclusão dos pacientes acometidos com AR, foram aceitos a participar do estudo voluntários com idade acima de 18 anos, diagnosticado com AR de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (Arnett *et al.*, 1988) e ACR/EULAR (Aletaha *et al.*, 2010).

Para compor o grupo controle de voluntários, foram aceitos a participar da pesquisa aqueles maiores de 18 anos sem diagnóstico de nenhuma condição clínica.

4.4.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram definidos, para ambos os grupos, em o não consentimento em participar do estudo; uso de medicamentos biológicos, ou voluntário imunocomprometido. Adicionalmente, as medicações em altas dosagens foram critérios de exclusão, bem como medicamentos anti-hipertensivos moduladores do sistema renina angiotensina aldosterona. A presença de doenças cardiovasculares também foi definida como ponto de corte. Portador de doenças reumatológicas além da AR, tumores, ou condições inflamatórias.

4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A partir da seleção, os pacientes foram convidados a participar do estudo e, ao aceitar, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi disponibilizado para leitura e assinatura. Após a assinatura do documento, foi então realizado o preenchimento da ficha clínica do estudo (APENDICE A) composta pelas variáveis de interesse. A avaliação clínica para preenchimento da ficha clínica foi realizada por médicos reumatologistas participantes do estudo, avaliando os critérios de diagnósticos definidos pelo CDAI e DAS28, segundo os critérios de classificação (Arnett *et al.*, 1988; Aletaha *et al.*, 2010). As outras variáveis analisadas para o diagnóstico da AR foram a avaliação do raio-x do local acometido (quando disponível), os exames laboratoriais de fator reumatóide, anti-CCP, PCR e VSH. Foram avaliadas também as comorbidades presentes no grupo de estudo, tais quais Diabetes mellitus,

obesidade, dislipidemia e osteoporose. De acordo com a sua consideração, o paciente julgou a sua etnia. O sexo, idade, tempo de doença também foram coletados.

4.6 COLETA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Foram coletados cerca de 15 ml de sangue venoso por punção venosa periférica à vácuo, utilizando tubo seco para obtenção do soro posteriormente e tubo heparinizado para a obtenção das PBMCs.

Após a coleta, o soro foi separado por centrifugação a 2000 rpm, aceleração 6, freio 4 por 10 minutos, e armazenado a -80C no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT situado no NUPIT-SG. Este material foi utilizado para posterior quantificação das citocinas do estudo através de ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores.

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico, o tubo de coleta utilizado foi o tubo heparinizado. Por centrifugação a 750g, aceleração 4, freio 0, por 20 minutos, e com a adição de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences) as células puderam ser separadas, obtidas e utilizadas nos testes de toxicidade e cultura celular para obtenção do sobrenadante de cultura. Para a obtenção do soro do sangue dos pacientes AR e voluntários controles, foi utilizado tubo seco com ativador de coágulo, e após centrifugação o soro foi armazenado a -80°C.

A velocidade de sedimentação das hemácias (VSH) foi determinada também no momento do atendimento com a adição do tubo específico para VSH que comporta 1,2mL (BD Bioscience) de sangue do paciente com AR, pois nem todos os pacientes possuíam este exame laboratorial.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES COM AR E GRUPO CONTROLE E NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE PBMCS DE PACIENTES COM AR

As citocinas foram quantificadas pelo método ELISA, do tipo sanduíche. Foram dosadas IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 (R&D Systems®) no soro dos pacientes acometidos com AR e no grupo controle. Os limites de detecção dos kits utilizados foram 7,8; 46,8; 62,5; 39,0; 11,7 e 31,2 pg/mL, respectivamente. Foram selecionadas citocinas ainda não publicadas na população brasileira.

Também foram quantificadas citocinas no sobrenadante de cultura pelo método ELISA sanduíche. Foram dosadas IL-1β, IL-6, IL-10, TNF e IFN-γ (BD Biosciences®), IL-2, IL-17A, IL-17F e IL-22 (EBioscience®) e IL-18 (R&D Systems®). Os limites de detecção dos kits utilizados foram 3,9; 4,6; 3,9; 7,8; e 4,68 pg/mL, respectivamente, para os kits BD Bioscience®. Os limites de detecção para IL-2, IL-17A, IL-17F e IL-22 foram 1,95; 3,9; 7,8; 15,6 pg/mL, respectivamente, para os kits da marca EBioscience®. Para o kit da marca R&D Systems o limite de detecção foi 46,8 pg/mL. Os testes foram realizados no sobrenadante de cultura de 6, 24 ou 48h, a depender do tempo de expressão da citocina e avaliados em seguida.

4.8 SEPARAÇÃO DE PBMCS PARA OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE CULTURA

As PBMCs foram isoladas por centrifugação com Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). As PBMCs isoladas foram ajustadas a 10^6 células por mL de meio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) além de 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco).

As PBMCs foram dispostas em placas de cultura. Em poço de cada cultura as células não foram estimuladas, para o controle negativo, e os outros poços foram estimuladas com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28 (eBioscience) nas concentrações de 300ng/ml e 400ng/ml (Colin *et al.*, 2010) respectivamente, como controle positivo e os poços das condiçoes na presença de enalapril ou losartana ou valsartana, além da Metilprednisona a 100μM. Estas células foram cultivadas em estufa de CO2 a 5% e 37°C por 48h.

Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 6, 24 e 48 horas de incubação para quantificação das citocinas do estudo. Os sobrenadantes coletados foram armazenados em microtubos de plásticos (eppendorf) e armazenados a -20°C para preservação dos analitos. A Metilprednisona (Pfizer®) foi utilizado como medicamento padrão como controle positivo para imunomodulação (Spurlock *et al.*, 2014).

4.9 TESTE DE CITOTOXICIDADE POR MTT

O teste de citotoxicidade para avaliação da toxicidade dos medicamentos pesquisados foi realizado em PBMCs isoladas, utilizando o método da redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Invitrogen™). Para tal estudo, as amostras foram

feitas em triplicata de dose e de experimento. Com o auxílio da câmera de Neubaeur foi realizado o ajuste celular para 10^6 células/100µl e em seguida foram adicionados o enalapril, losartana e valsartana nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100µM.

Após 48 horas em estufa a 5% de CO2 a 37°C, foram adicionados 20µL da solução de MTT 0,5mg/ml e o experimento fora incubado por 3 horas nas mesmas condições. Em seguida, foi adicionada a solução de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) a 20% para dissolução do precipitado formado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplaca a 570nm após 24 horas. Quanto mais intensa foi a coloração azulada da conversão do MTT, mais células viáveis estavam presentes, demonstrando o grau de toxicidade do medicamento testado frente a PBMCs.

4.10 AVALIAÇÃO *IN VITRO* NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PBMCS

4.10.1 Extração Proteica

Para a extração de proteínas, foram utilizadas células imortalizadas U937 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro – UFRJ. Estas células são utilizadas como modelo para testes inflamatórios de mediadores nucleares (Baek *et al.*, 2009). As células U937 foram mantidas em cultivo no meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) além de 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco).

Atingindo a confluência acima de 80% da garrafa, as células foram ajustadas para $5x10^6$ e dispostas em 5ml de meio de cultura. As condições de estudo foram sem estímulo, com estímulo por Lipopolissacarídeo (LPS) a 5µg/ml (Sigma-Aldrich). As outras condições foram organizadas com o desenho do experimento. Uma condição para cada um dos tratamentos: uma com anti-inflamatório não seletivo de COX ½, o ácido acetilsalicílico a 100µM, uma com inibidor seletivo de COX-2, a dexametasona a 10µM, a Metilprednisona a 100µM que também foi utilizada nas culturas de PBMCs, e os anti-hipertensivos enalapril, losartana e valsartana a 100µM cada.

Após 48h, as células foram previamente lavadas duas vezes com PBS 1x gelado e lisadas com tampão detergente composto por 50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100. As células foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 min à 4ºC. Esta etapa tem por objetivo a obtenção da fração proteica citoplasmática solúvel.

A fração nuclear foi conseguida com a adição de tampão de lise nuclear composto por 20mM Hepes, 630mM NaCl, 0,2mM EDTA, 25% Glicerol. A etapa de centrifugação foi realizada da mesma forma que a primeira. Ambas as frações foram unidas e adicionadas de 1% de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich). As frações foram homogeneizadas e a dosagem de proteínas foi realizada com o kit de quantificação Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Para leitura das amostras, foi utilizado um leitor de microplacas em comprimento de onda de 570nm.

4.10.2 Western Blotting

As amostras proteicas extraídas foram quantificadas e submetidas à eletroforese vertical em gel de acrilamida/bisacrilamida. O gel destinado à separação molecular contém Tris 0,375M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, persulfato de amônio (APS, Sigma-Aldrich) 0,03% em N,N,N-tetra-metilenodiamina (TEMED, Sigma-Aldrich) enquanto o gel de empilhamento é comporto por TRIS 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, acrilamida 4%, APS 0,045%, e TEMED.

A eletroforese foi realizada e seguida de transferência pelo Sistema de Transferência Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad) para membrana de PVDF (Hydrophobic polyvinililidene difluoride, GE Healthcare), por 17 minutos, 20 volts e amperagem 1.3.

Após a transferência, a membrana foi depositada na solução de bloqueio para impedir ligações inespecíficas, utilizando leite seco desnatado 5% (p/v) em PBS–Tween 0,5%, “overnight” (durante uma noite inteira, cerca de 12h). A membrana foi lavada três vezes com PBS-Tween 0,5% e incubada com os anticorpos: rabbit policlonal IgG anti-NFκB (Santa Cruz Biotechnology) e monoclonal goat IgG anti-Histona H3 (Santa Cruz Biotechnology) diluídos na solução de bloqueio e mantidos por 6h a 4°C.

Após o tempo de incubação estabelecido, a membrana sofreu novamente o processo de lavagem por três vezes e foi incubada com o anticorpo secundário monoclonal IgG anti-goat/anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) por 2 horas a 4°C. Após o tempo de incubação estabelecido, foi realizada novamente uma sequência de três lavagens e procedida a revelação por quimioluminescência (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) segundo as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as amostras de soro, foram apresentadas em mediana, máxima e mínima com margem de erro de 5%. Para a avaliação estatística dos grupos AR e GC, nos casos em que o conjunto amostral não passou no teste de hipótese pelo teste Shapiro-Wilk, foi usado o teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Os testes de correlação de Pearson e Spearman foram utilizados para as análises de correlação, onde Pearson foi utilizado como teste de força de correlação e o teste de Spearman como teste monotônico de correlação, o qual é importante para duas variáveis ordinais.

Nas análises de cultura, para comparar a amostra de estímulo com a amostra em adição do medicamento, foi utilizado o teste de Wilcoxon, por utilizar de amostras pareadas não paramétricas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.12 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O Projeto foi submetido e aprovado no COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, localizado no 3º andar, Sala Prof. Rui João Marques. Página da Internet: www.ufpe.br/ccs. O endereço eletrônico é cepccs@ufpe.br; fone: (81)2126-8588; Presidente: Prof. Dr. Geraldo Bosco. O parecer consubstanciado do trabalho no CEP é o registro de número 1.486.212 e o CAAE: 53555116.0.0000.5208 (Anexo 2).

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS SÉRICOS

5.1.1 Recrutamento e avaliação clínica, laboratorial e demográfica dos voluntários da pesquisa

O estudo incluiu 140 pacientes voluntários diagnosticados com AR com média de idade 54.0 (±12.0) em anos e tempo de duração da doença 10.0 (±7.8) anos. O grupo de voluntários saudáveis, consistindo em um grupo controle (GC) consistiu de 40 voluntários com uma média de idade de 51.5 (±8.5) anos, pareados por sexo e idade. A velocidade de sedimentação das hemácias (VSH) também foi avaliada no grupo AR e a média dos valores de hemossedimentação foi 36 ±23. Os Pacientes AR foram inclusos após a avaliação clínica a qual consistiu do preenchimento de ao menos 4 ou mais critérios de acordo com os critérios da ACR/EULAR (2010) de avaliação e classificação da doença. A **Tabela 4** apresenta os dados clínicos, laboratoriais e demográficos dos voluntários recrutados para o estudo.

Tabela 4. Parâmetros clínicos e Laboratoriais dos voluntários acometidos com AR e controles saudáveis.

DADOS CLÍNICOS	AR	GC	p
Grupo amostral n (%)	140	40	ns
Mulheres	130 (92,8)	33 (82,5)	
Homens	10 (7,2)	7 (17,5)	
Idade em anos, média ± DP	54.0 (±12.0)	51.5 (±8.5)	ns
Tempo de doença, anos, média ± DP	10.0 (±7.8)	-	-
Fator Reumatóide n (%)		-	-
+	113 (80.7)		
-	27 (19.3)		
VSH mm/h, mediana, variação	36 (2 – 125)	-	-
Classificação da Doença n (%)		-	-
CDAI			
Baixo índice de atividade (≤ 10)	45 (32)		
Moderado e Alto índice de atividade (> 10**)**	95 (68)		
CDAI, média ± DP	18.5 (±13.0)		
DAS28			
Baixo índice de atividade (≤ 3.2)	31 (22,2)		
Moderado e Alto índice de atividade (> 3.2**)**	109 (77,8)		
DAS28, média ± DP	4.5 (±1.5)		
Tratamentos (associação/único) n		Sem tratamento	-
Nenhum	60		
Prednisona	45/10		
Metotrexato	43/12		
Leflunomida	10/7		
Corticosteroides	8/1		
Associação Medicamentosa n			
Prednisona + Metotrexate	32		
Prednisona + Leflunomida	6		
Prednisona + Corticosteroides	1		
Prednisona + Metotrexato + Leflunomida	4		
Prednisona + Metotrexato + Corticosteroides	2		
Metotrexato + Corticosteroides	5		

Comorbidades (associação/única) n		Sem	-
Nenhuma	106	comorbidade	
Diabetes Mellitus	8/1		
Obesidade	4/2		
Osteoporose	6/6		
Câncer	0/1		

Fonte: Elaborada pelo Autor

Dos 140 pacientes recrutados, 16 foram selecionados randomicamente para os estudos *in vitro* de avaliação da imunomodulação dos anti-hipertensivos. Destes dezesseis voluntários, 2 eram homens e 14 mulheres, com média de idade 53 anos (±14). A média do tempo de doença dos selecionados ficou com 10 anos de duração (±7,9), e do grupo 8 se consideravam pardos, três negros e cinco brancos. Os dados clínicos e laboratoriais do grupo AR para a realização da cultura podem ser visualizados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Parâmetros clínicos e Laboratoriais dos voluntários acometidos com AR selecionados para o teste de cultura celular.

DADOS CLÍNICOS	AR
Mulheres n	14
Homens n	2
Idade em anos, média ± DP	53 (32 – 73)
Tempo de doença, anos, média ± DP	10 (±7,9)
CDAI	
Baixo índice de atividade (≤ 10)	8 (50%)
Moderado e Alto índice de atividade (> 10**)**	8 (50%)
CDAI, média ± DP	16 (±17)
DAS28	
Baixo índice de atividade (≤ 3.2)	9 (56%)
Moderado e Alto índice de atividade (> 3.2**)**	7 (44%)
DAS28, média ± DP	3,7 (±1,7)
Tratamento (%)*	
Nenhum	3
Prednisona	9
Metotrexato	11
Leflunomida	2
VSH mm/h, mediana, variação	16 (±10)
Fator Reumatóide n (%) +	16 (100%)

***** Oito pacientes estavam em uso de Prednisona e Metotrexato em combinação e apenas um em combinação de Metotrexato e Leflunomida.

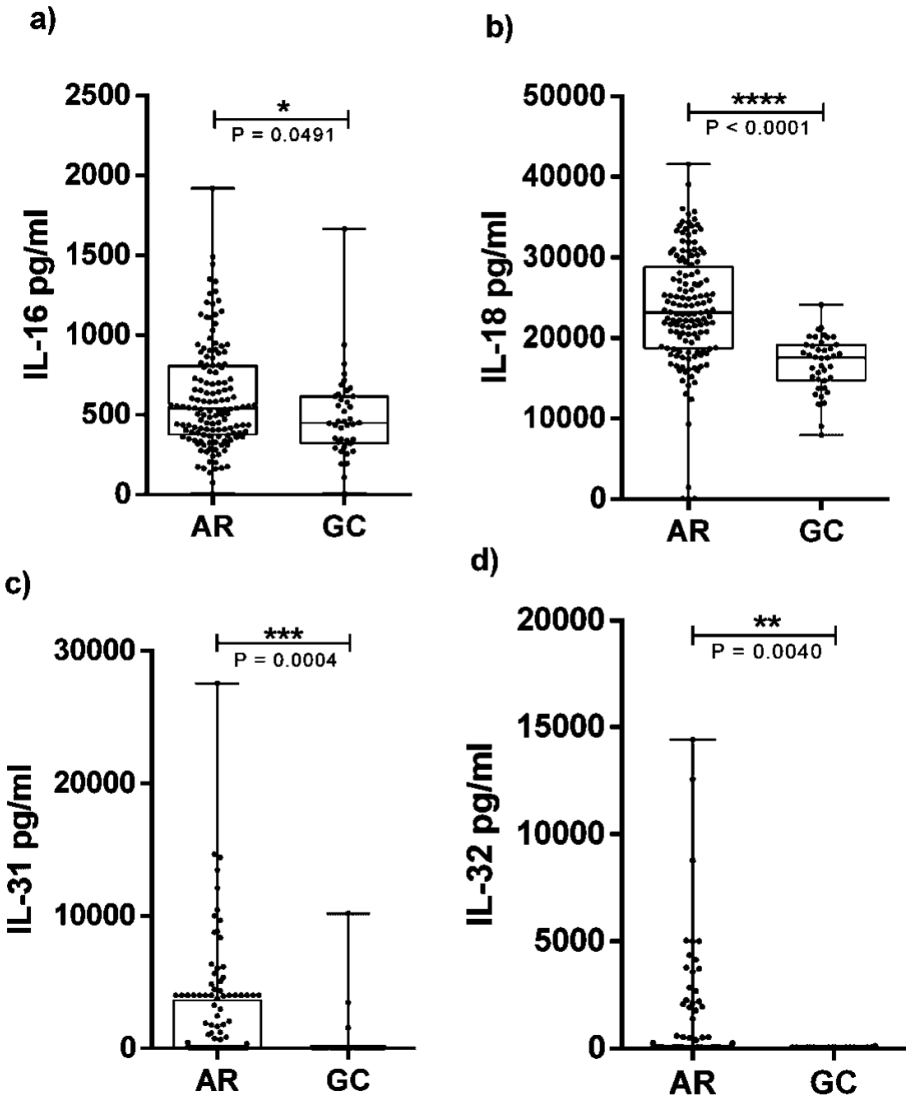
Fonte: Elaborada pelo Autor

5.1.2 Avaliação sérica da IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 dos pacientes AR em comparação ao GC

O soro dos 140 pacientes recrutados foi utilizado para as dosagens séricas de citocinas inflamatórias por ELISA. Foram encontrados níveis significativamente aumentados das citocinas IL-16, IL-18, IL-31 e IL-32 no soro de pacientes com AR comparado aos controles saudáveis e podem ser vistos na **Figura 10**. A IL-16 na AR apresentou valores de mediana [539,1 (1919,1-7,8) pg/ml] enquanto o GC apresentou, respectivamente, [449,4 (1664,6-7,8) pg/ml] (p = 0.0491). Os níveis de IL-18 no grupo AR foram: mediana [23150,0 (41548,0-46,8)

pg/ml] enquanto o GC apresentou [17562,0 (24084,0-7944,0) pg/ml] ($p < 0.0001$). Em relação aos níveis de IL-31, no grupo AR foram [62,5 (27550,0-62,5) pg/ml] enquanto o GC apresentou [62,5 (10194,2-62,5) pg/ml] ($p = 0.0004$). Por fim, aos níveis de IL-32, no grupo AR [39,1 (14425,3-39,1) pg/ml] enquanto o GC apresentou [39,1 (114,8-39,1) pg/ml] ($p = 0.0040$). Embora aparentemente aumentados, os níveis de IL-33 e IL-34 não foram significativos no soro do grupo AR em relação ao GC (dados não mostrados). Os dados dos níveis séricos das citocinas IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 podem ser vistos na **Figura 10**.

Figura 10 – Níveis séricos de IL-16, IL-18, IL-31 e IL-32 de pacientes acometidos com AR e no GC.



Na figura observa-se que as citocinas IL-16 (a), IL-18 (b), IL-31 (c) e IL-32 (d) estão aumentadas estatisticamente significativas no soro de pacientes com Artrite Reumatoide (AR) em comparação ao Grupo Controle (GC).

Fonte: Elaborada pelo Autor

5.1.3 Associação e correlação dos níveis séricos das citocinas IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 com os demais dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com AR

Após observar a associação positiva das citocinas séricas frente aos controles, buscou-se encontrar associações e correlação destas citocinas que foram estatisticamente significativas para a AR, comparando com os dados clínicos e laboratoriais solicitados dos pacientes no momento do atendimento. Não houve associação ou correlação dos níveis séricos das citocinas com o grupo étnico, o sexo, o CDAI ou o DAS28, o FR e nem o Tempo de Doença. Os valores de p das associações e correlações realizadas podem ser vistas na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Dados clínicos e laboratoriais comparados com os níveis das citocinas séricas dosadas no soro de pacientes AR e os valores estatísticos de p.

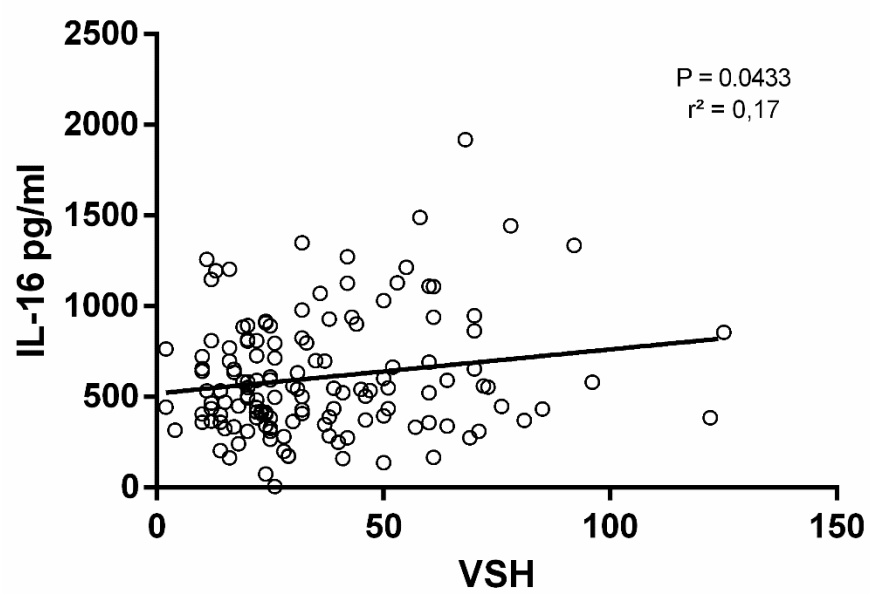
Citocinas	**IL-16**	**IL-18**	**IL-31**	**IL-32**	**IL-33**	**IL-34**
Parâmetros						
Etnia	0.917	0.758	0.417	0.833	0.518	0.328
Sexo (mas/fem)	0.531	0.681	0.906	0.803	0.377	0.867
CDAI	0.451	0.293	0.212	0.739	0.549	0.124
DAS28	0.280	0.867	0.580	0.656	0.955	0.106
FR	0.103	0.563	0.623	0.604	0.953	0.697
Tempo de Doença	0.230	0.547	0.364	0.885	0.926	0.536

FR – Fator Reumatóide

Fonte: Elaborada pelo Autor

Dos parâmetros clínicos para avaliação da gravidade da doença, apenas o VSH apresentou correlação com os níveis séricos de IL-16. A correlação da citocina com o VSH pode ser vista na **Figura 11**.

Figura 11 – Correlação entre os níveis de IL-16 no soro de pacientes com AR e o valor laboratorial do VSH.

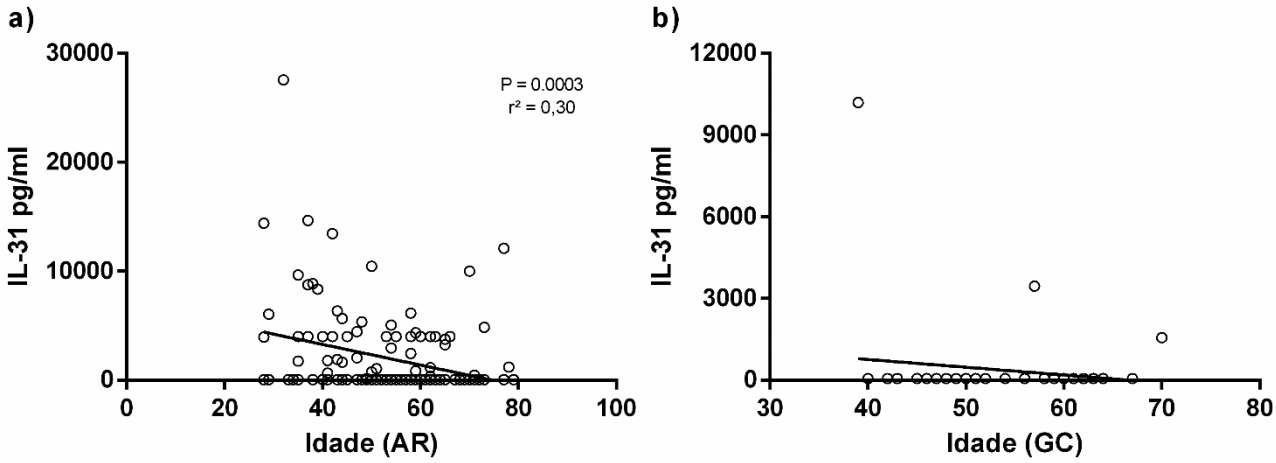


A correlação positiva com os níveis de IL-16 mostram que quanto maior o VSH do paciente, maiores eram os níveis desta citocina ($p = 0,0433$ / $r^2 = 0,17$).

Fonte: Elaborada pelo Autor

Para a IL-31 foi possível observar uma correlação negativa para a idade. Quanto mais avançada era a idade dos pacientes, menores eram os níveis séricos da IL-31 ($p = 0.0003$). Fato também observado nos controles saudáveis, sem resultado estatisticamente significativo, como mostra a **Figura 12**.

Figura 12 – Correlação entre os níveis da IL-31 e a idade dos pacientes com AR.



A figura a mostra uma correlação negativa entre os níveis de IL-31 e o avanço da idade dos pacientes com AR, porém não pode ser observada a mesma correlação quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo Autor

5.1.4 Associação da IL-16, IL-18, IL-31 e IL-32 no soro de pacientes AR e o tratamento utilizado na clínica

Os níveis séricos das citocinas avaliadas foram comparados ao tratamento que os pacientes utilizavam. Os grupos foram selecionados como descritos na Tabela 4. Foram feitas duas avaliações, as associações medicamentosas com a Leflunomida e outra inclusos apenas os pacientes em tratamento único para evitar viés de resultados em relação a associação medicamentosa, com exceção do grupo em uso de outros corticosteroides (CE) devido ao n (1) e não pode ser analisado.

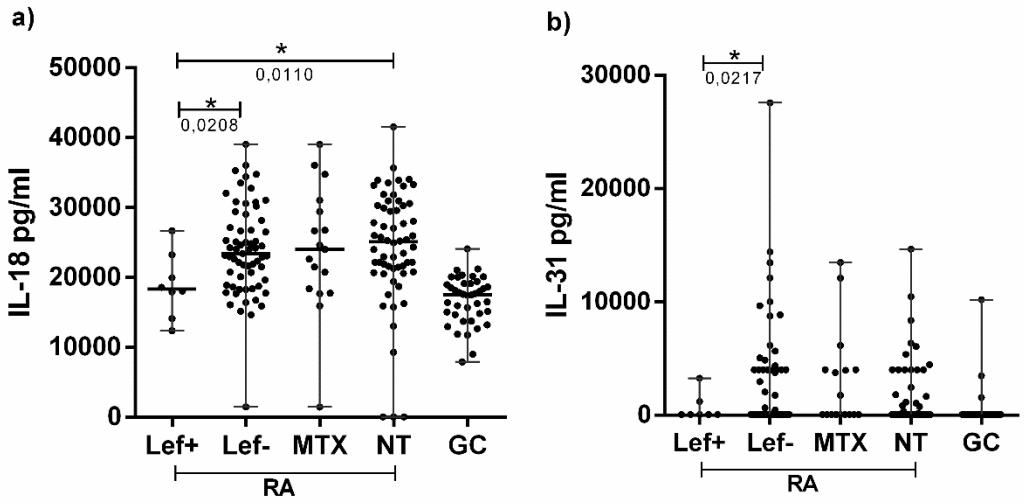
Pode-se observar que a Leflunomida (Lef) aparenta ser responsável em diminuir os níveis de IL-18 e IL-31 na circulação destes pacientes. Os níveis de IL-18 de Lef+ [18080.0 (12380.0 – 26668.0) pg/ml] foram mais baixos e estatisticamente significativos em comparação aos pacientes que outras medicações que não Leflunomida (Lef-) [23310.0 (16440.0 – 28168.0) pg/ml] ($p = 0.0208$), também em relação aos pacientes que tomavam apenas Metotrexato (MTX) [25722.0 (1480.0 – 39048.0) pg/ml] ($p = 0.0033$) e mais baixos que os pacientes que não estavam sob nenhum tratamento [25108.0 (46.8 – 41548.0) pg/ml] ($p = 0.0110$). Em relação ao GC não houve diferença estatisticamente significativa com o grupo que tomava Lef,

mostrando que os níveis séricos da IL-18 estavam equiparados. Todos os outros pacientes dos grupos de tratamento apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao GC com os níveis séricos de IL-18 aumentados.

Em relação aos níveis de IL-31 de Lef+ [62.5 (62.5 – 3250.0) pg/ml] foram mais baixos e estatisticamente significativos em comparação aos pacientes que não tomavam outras medicações que não Leflunomida (Lef-) [62.5 (62.5 – 13450.0) pg/ml] (p = 0.0217). Em relação ao GC não houve diferença estatisticamente significativa com o grupo que tomava Lef, mostrando que os níveis séricos da IL-31 também estavam equiparados. Nenhuma associação estatística foi observada nas citocinas IL-16, IL-32, IL-33 e IL-34.

A **Figura 13** mostra os níveis séricos das citocinas IL-18 e IL-31 em associação medicamentosa ou não dos tratamentos que os pacientes utilizavam, além de apresentar também os níveis séricos dos 60 pacientes AR não tratados (NT) e os níveis séricos do GC estudado. É importante ressaltar que os pacientes que tomam Lef+ tiveram seus níveis de IL-18 e IL-31 equiparados aos do GC.

Figura 13 – Níveis séricos das citocinas IL-18 e IL-31 no soro de pacientes com AR divididos em subgrupos.



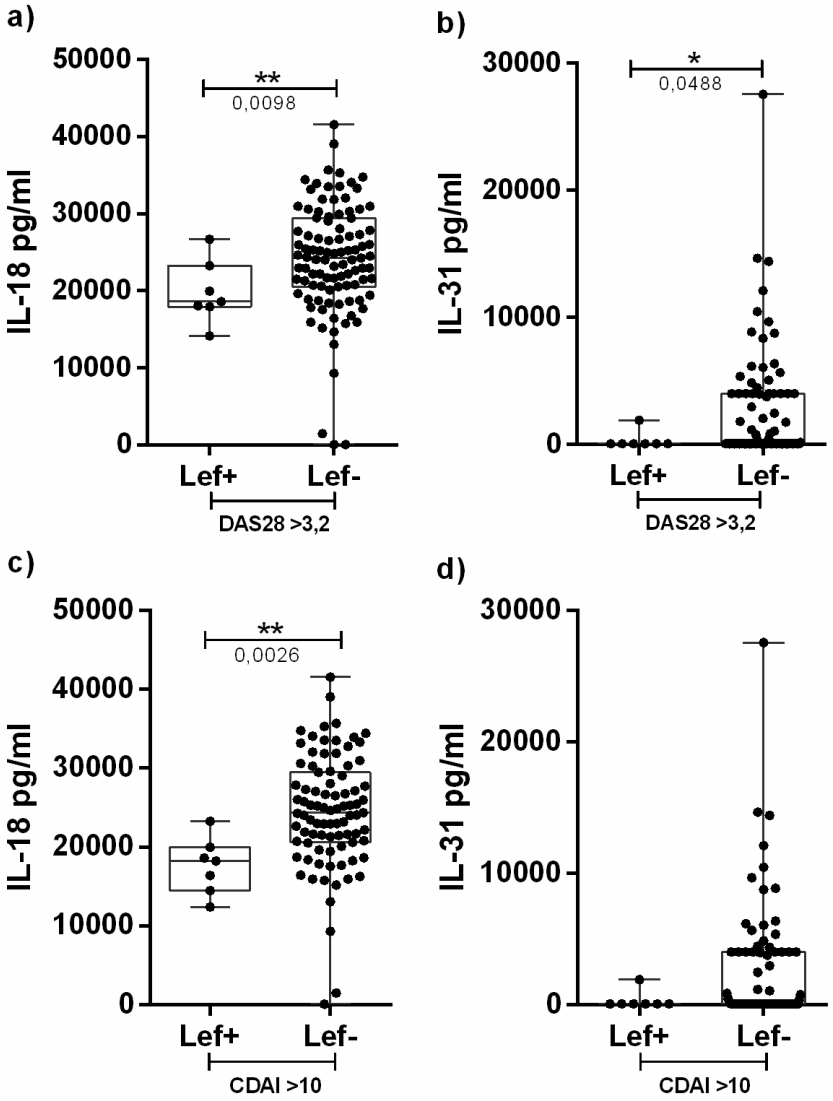
Os níveis de IL-18 (a) aparecem em menor quantidade no soro de pacientes com AR que tomam a Leflunomida (Lef+) como tratamento, apresentando a expressão desta citocina a níveis similares ao dos controles saudáveis (GC). A IL-31 (b) apresenta níveis mais baixos de expressão em pacientes com AR que também estavam sob o uso de Lef+ em relação aqueles pacientes que não utilizavam a Lef- como tratamento.

Fonte: Elaborada pelo Autor

5.1.5 Avaliação dos níveis séricos de IL-18 e IL-31 com a Leflunomida e a gravidade da doença

Foram avaliados os níveis séricos de IL-18 e IL-31 e sua associação com a gravidade da doença, a partir dos pacientes que faziam o tratamento com a Leflunomida. É possível observar que quem está sob tratamento com Leflunomida apresenta níveis mais baixos de IL-18 ($p = 0.0020$) e de IL-31 ($p = 0.0488$) em relação a gravidade da doença pelo DAS28. Já em relação ao CDAI, os níveis de IL-18 foram estatisticamente significativos mais baixos nos pacientes em uso da Leflunomida ($p = 0.0026$). Os resultados podem ser vistos na **Figura 14**.

Figura 14 – Associação dos níveis de IL-18 e IL-31 nos pacientes com AR em uso ou não da Leflunomida em índice de atividade da doença em moderado a grave.



É possível observar que os níveis de IL-18 (a e b) são menores nos pacientes com AR que estão sob o tratamento com a L, mesmo tendo um índice de atividade da doença alto, seja pelo CDAI ou pelo DAS28. A IL-31 (c e d) se mostra estatisticamente significativa apenas quando separados os grupos pelo DAS28.

Fonte: Elaborada pelo Autor

5.2 RESULTADOS *IN VITRO* EM PBMCS E U937

5.2.1 Imunomodulação do Enalapril, Losartana e Valsartana frente a PBMCs de pacientes portadores de Artrite Reumatoide

Primeiro foi realizado o teste de citotoxicidade para avaliação da toxicidade dos anti-hipertensivos frente a PBMCs. Este foi realizado pelo método MTT em triplicata de dose e de experimento. Não houve morte celular causada pelos medicamentos testados, assegurando os testes realizados, com suas respostas em diminuição dos níveis das citocinas apenas por modulação e não causados por morte celular. Não houve nenhum resultado de associação significativo ($p < 0.05$) para exclusão de dose testada.

Em seguida, foram realizadas culturas para avaliar os níveis expressos das citocinas IFN-γ, TNF, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-18 e IL-22, que podem ser vistos na **Figura 15**. Mediana, máxima e mínima expressam os valores obtidos.

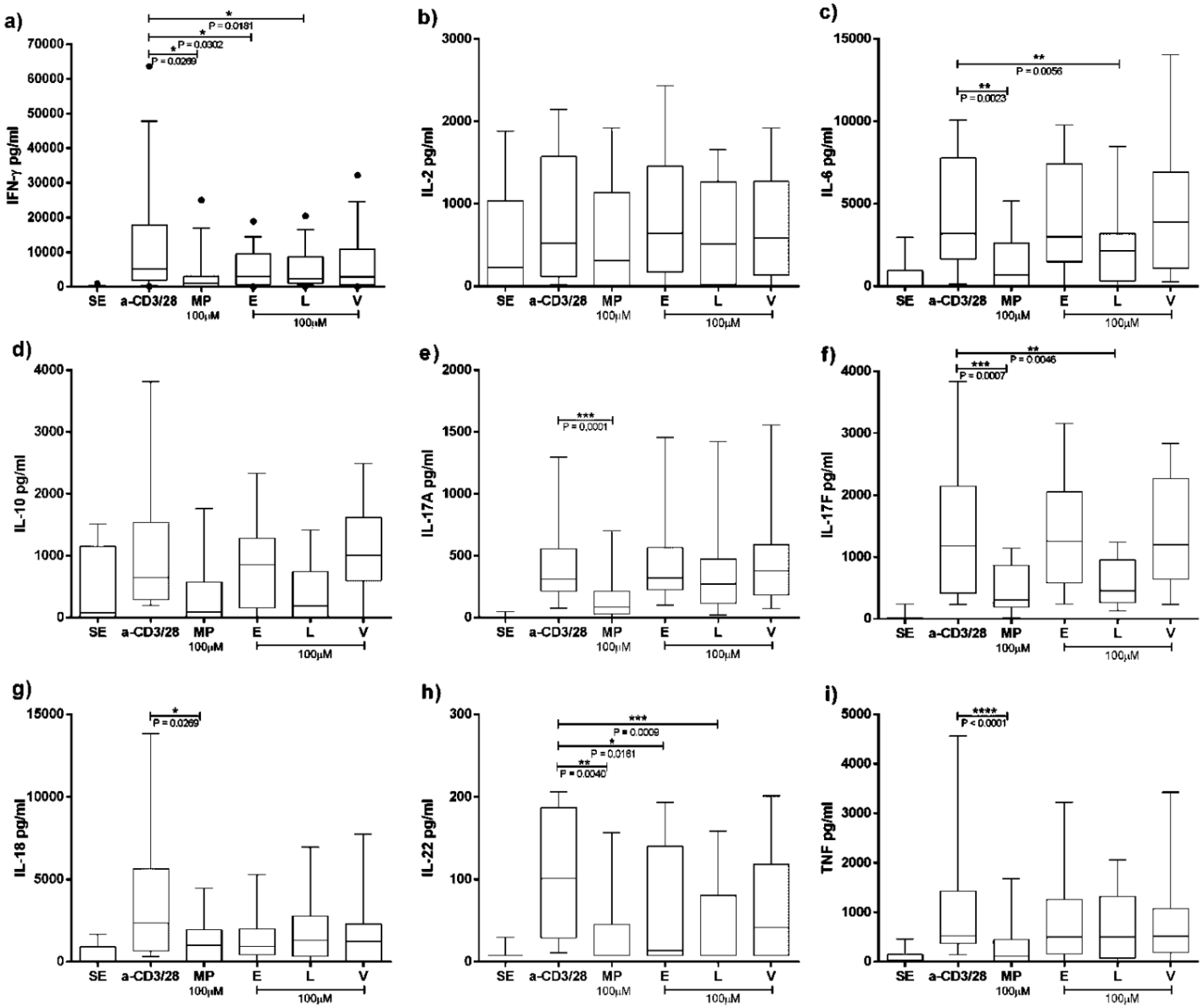
O Enalapril (E) foi capaz de causar uma redução significativa nos níveis de IFN-γ na dose de 100µM [2988.53 (18895.29 - 4.68)] ($p = 0.0302$) quando comparado com a condição estimulada com anti-CD3 e anti-CD28 (a-CD3/28) [5157.895 (63637.65 - 155.29)]. Uma modulação do E também pode ser observada nos níveis de IL-22 [13.65 (195.58 - 7.81)] quando comparado aos níveis da condição de estímulo [100.84 (218.67 - 9.50)] ($p = 0.0161$).

A Losartana foi capaz de reduzir estatisticamente significativo os níveis de IFN-γ, IL-6, IL-17F e IL-22 em relação a condição estimulada com anti-CD3 e anti-CD28. Para os níveis de IFN-γ no tempo de 48h, houve uma redução significativa na presença da losartana a 100µM [2252.6 (20461.10 - 4.68)] quando comparada com a condição de estímulo [5157.895 (63637.65 - 155.29)] ($p = 0.0181$).

Para a IL-6 no tempo de 24h, também foi possível observar uma redução na expressão desta citocina [2154.2 (8480.8 - 4.6)] em relação a condição estimulada [3178.60 (10064.8 - 136.4)] ($p = 0.0056$). Também foi encontrada uma redução estatisticamente significativa na expressão da IL-17F no tempo de 48h [457.6 (1239.8 - 129.6)] em relação a condição estimulada [1181.5 (3836.5-236.0)] ($p = 0.0046$). Adicionalmente, a Losartana também foi capaz de reduzir significativamente os níveis expressos de IL-22 [100.4 (175.5-7.8)] quando comparado a condição de estímulo [100.84 (218.67-9.50)] ($p = 0.0234$).

A Valsartana (V) não mostrou nenhuma associação positiva para redução dos níveis das citocinas quantificadas. Não houve modulação observada nos níveis expressos de IL-2, IL-10, IL-17A, IL-18 e TNF. Não foi possível detectar os níveis de IL-1β nos sobrenadantes de cultura de 6 ou de 24h (dados não apresentados). Os resultados podem ser visualizados na **Figura 15**.

Figura 15 – Níveis de expressão de IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-22 e TNF em sobrenadante de cultura de PBMCs de pacientes com AR após exposição ao Enalapril, Losartana ou Valsartana



É possível observar que a Losartana (L) a 100µM foi capaz de reduzir significativamente os níveis de expressão de IFN-γ (a), de IL-6 (c), da IL-17F (f) e da IL-22 (h). O Enalapril (E) a 100µM foi capaz de reduzir os níveis de IFN-γ (a) e da IL-22 (h). Os valores de p se encontram na imagem. Não foi observada uma redução estatisticamente significativa pela Valsartana (V). A Metilprednisolona (MP) foi utilizada como medicamento imunomodulador padrão. Como controle negativo de secreção de citocinas, o primeiro poço continham células sem estímulo (SE).

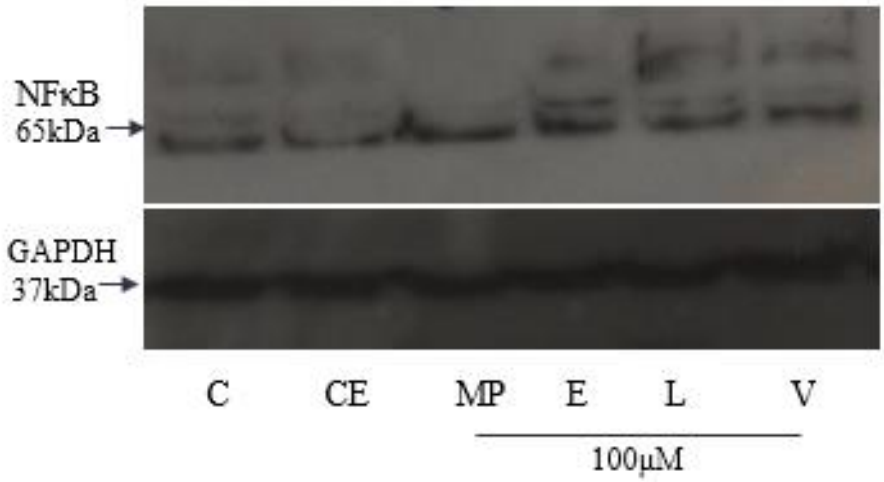
Fonte: Elaborada pelo Autor

5.2.2 Avaliação do mecanismo de ação do Enalapril, Losartana e Valsartana pelo NFκB frente a células U937

Inicialmente o teste de citotoxicidade avaliação da toxicidade dos anti-hipertensivos frente a células U937 foi realizado pelo método MTT, em triplicata de dose e de experimento. Não houve morte celular causada pelos medicamentos testados.

Após o teste de citotoxicidade, as proteínas extraídas das células U937 foram utilizadas para avaliar a modulação de NFκB por Western Blotting. Os anti-hipertensivos testados parecem diminuir a expressão do fator de transcrição NFκB, como pode ser observado na **Figura 16**.

Figura 16 – Expressão do NFκB em células U937 em cultura com E, L e V a 100μM mostra que a Losartana foi o único a modular o NFκB.



A modulação do NFκB pôde ser observada apenas nas células que foram tratadas com Losartana (L), mas não naquelas condições com Enalapril (E) e Valsartana (V). A Metilprednisona (MP) a 100μM foi utilizados como controles de expressão.

Fonte: Elaborada pelo Autor

6 DISCUSSÃO

Como já é bem descrito na literatura, a AR está aumentada em pacientes do sexo feminino (Khnaba *et al.*, 2016; Svensson *et al.*, 2016). O recrutamento dos pacientes com artrite reumatóide no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas foi de 130 pacientes mulheres e 10 homens, ainda de acordo com o critério da AR acometer as mulheres em idades mais jovens que os homens, caracterizando uma doença tardia nos pacientes do sexo masculino (Goemaere *et al.*, 1990; Frisell *et al.*, 2016). Além disso, há a discussão do risco de DCV ser aumentado em pacientes mulheres que entraram precocemente na menopausa (Pfeifer *et al.*, 2014) o que leva ao aumento das DCV como comorbidades associadas a AR (England *et al.*, 2018).

É sabido que citocinas como IL-6, IL-17, IL-22 e TNF estão aumentadas no soro de pacientes com AR do Brasil (Da Rocha, L. F. *et al.*, 2012; Da Rocha Junior *et al.*, 2013), e que citocinas como IL-16, IL-18, IL-31, IL-32, IL-33 e IL-34 estão relacionadas com a AR, seja presentes no soro ou na sinóvia, e até associada a gravidade de outras doenças, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (Morel *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2005; Petrovic-Rackov e Pejnovic, 2006; Favilli *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Rivière *et al.*, 2018).

Nos resultados demonstrados, encontramos altos níveis de IL-16, IL-18, IL-31 e IL-32 no soro de pacientes com AR em comparação a controles saudáveis, o que corrobora com os achados dos estudos citados. Porém, em desencontro, não foi encontrada nenhuma correlação clínica com a gravidade da doença.

A IL-16 está presente em altos níveis no soro de pacientes com AR e também está correlacionada com a destruição articular destes indivíduos (Lard *et al.*, 2004). Em cultura de sinoviócitos derivados de fibroblastos, foi demonstrado que em um ambiente onde há a presença de IL-17, esta citocina pró-inflamatória tem a capacidade de estimular estas células a produzirem e secretarem IL-16 no meio, mas não IFN-γ, IL-1β ou IL-15, outras citocinas chaves no desenvolvimento da AR. Foi observado também que apenas sinoviócitos de pacientes com AR, mas não de pacientes com Osteoartrite, conseguiam produzir a IL-16 (Cho *et al.*, 2008), o que implica em uma potencial ação pró-inflamatória deste mediador.

Ainda não se sabe ao certo como a IL-16 atua na AR, porém é indicada como um bom marcador de parâmetro clínico mais eficaz do que a MMP-3, a proteína C-reativa ou até mesmo a velocidade de hemossedimentação para pacientes com AR em uso apenas de MTX ou em MTX com resposta inadequada ao tratamento. A IL-16 poderia ser um biomarcador útil para avaliar a resposta clínica em pacientes com AR em início de tratamento (Murota *et al.*, 2016).

Encontrando níveis mais elevados de IL-16 no soro de pacientes com AR no Brasil pode ser o primeiro passo para desvendar como essa citocina está atuando na doença.

Em linfohistiocitose hemofagocítica, uma condição rara, relacionada à hiperativação imunológica, que desencadeia um estado hiperinflamatório, foi mostrado uma correlação positiva dos níveis séricos de IL-16 com a IL-18 (Takada *et al.*, 2004). Nossos resultados também demonstram altos níveis de IL-18, assim como a IL-16, no soro de pacientes com AR em comparação aos controles saudáveis, o que aponta para o caráter pró-inflamatório destas duas citocinas.

Além de demonstrarmos os valores de IL-18 aumentados na AR, foi possível observar que pacientes AR que tomavam o medicamento Leflunomida apenas apresentavam menores níveis desta citocina, níveis tão baixos similares aos níveis encontrados no grupo controle. Em relação ao uso da L e o índice de atividade da doença medido por CDAI e DAS28, foi possível observar também que aqueles que não estavam em tratamento apresentavam maiores níveis da IL-18.

A Il-18 vem sendo estudada na AR faz algum tempo e está correlacionada com a gravidade e com o dano articular em ação conjunta com IL-15 e IL-12 (Gracie *et al.*, 1999) e até correlacionada com a presença aumentada de Mieloperoxidase aumentando o dano na sinóvia de pacientes AR (Nzeusseu Toukap *et al.*, 2014). Em adição, a IL-18 também já foi encontrada em níveis elevados em doenças inflamatórias como o LES (Favilli *et al.*, 2009), gota (Cavalcanti *et al.*, 2016), e provavelmente participa de uma via importante de produção de fatores inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias.

A Il-18 foi encontrada em altos níveis na sinóvia de pacientes com AR e correlacionada com o aumento do RANKL ligado a membrana celular, o RANKL solúvel, M-CSF, GM-CSF, e Osteoprotegerina em culturas de sinoviócitos diferenciados de fibroblastos provenientes de pacientes com AR. Com isso, é possível compreender que a IL-18 está intimamente ligada a efeitos indutores e promotores de maturação de osteoclastos, células responsáveis pelo desgaste ósseo (Zhang *et al.*, 2013). Estes dados só confirmam que a IL-18 estaria, então, de alguma forma presente na AR.

A Leflunomida é uma droga antirreumática modificadora do curso da doença. Este medicamento apresenta bons resultados na melhora do quadro clínico do paciente, aumentando a qualidade de vida do paciente (Scott, 1999). A Leflunomida causa uma regulação negative nos níveis de MMP-1, MMP-3, IL-6 e IL-10, o que sugere sua ação na Imunopatologia da AR (Litinsky *et al.*, 2006).

Os pacientes que estavam sob tratamento da Leflunomida apresentaram níveis mais baixos de IL-18 no soro do que pacientes em uso de Metotrexato e Prednisona, e até similares aos níveis encontrados no grupo controle, assim, o uso da Leflunomida está associado com a diminuição dos níveis séricos da IL-18.

Um estudo de seguimento com pacientes AR antes e depois do uso da Leflunomida como tratamento demonstrou que níveis de IL-8 e MCP-1 foram reduzidos. Consequentemente, também foi observada uma correlação negativa com o índice de atividade da doença (Klimiuk *et al.*, 2009).

Complementarmente pacientes em CDAI e DAS28 classificados como moderado a alto foram divididos em dois grupos, os que utilizavam e os que não utilizavam a Leflunomida como tratamento. Da mesma forma, também foi observado que aqueles pacientes que mesmo em DAS28 e CDAI moderado a alto, mas em uso da Leflunomida, tiveram os níveis de IL-18 mais baixos em relação aqueles que não utilizavam nenhum tratamento.

Alguns estudos vem correlacionando a IL-18 com a patogênese da AR (Zhang *et al.*, 2013) e seu aumento tanto no soro quanto na sinóvia de pacientes acometidos com a doença (Dai *et al.*, 2004; Petrovic-Rackov e Pejnovic, 2006). Não foi encontrado em nosso estudo a correlação dos níveis de IL-18 correlacionado com a gravidade da doença. O questionamento deve então direcionar para como a IL-18 pode atuar na AR e se algum polimorfismo pode ser fator determinante para a severidade da doença.

A comparação de subtipos da doença por grupos étnicos com detalhamento celular e molecular pode avançar em novas hipóteses e para testes clínicos futuros. O fator étnico pode ser um fator que cause confusão em correlações clínicas e explicações de como fatores inflamatórios podem estar agindo, assim não diferente, na AR, o fator étnico pode apresentar diferenças no padrão de citocinas inflamatórias na patogenia da doença e fatores fenotípicos fodem ser influenciados por fatores genéticos e ambientais. Com este direcionamento, é sabido que o polimorfismo da IL-18 está diretamente relatado com a severidade da AR na população indiana. Esta população apresenta o alelo C e o genótipo CC na posição -607 e o genótipo CC na posição -137 são correlacionados com os fatores de risco para a AR (Cai *et al.*, 2014). Por outro lado o alelo A e o genótipo AA na posição -607 e o genótipo CC na posição -137 tem efeitos protetivos na AR na mesma população (Gurram *et al.*, 2014).

Outro achado, por exemplo, sugere que a frequência alélica e genotípica da IL-18 na posição -607 tem uma diferença significativa entre pacientes AR e grupos controles na população chinesa (Ying *et al.*, 2011). Em adição, o polimorfismo associado com a gravidade da doença na AR foi encontrado nos alelos -607A/C, -920C/T, e -105A/C da IL-18 (Li, L. L. *et al.*, 2016). Complementando, o polimorfismo da IL-18 na posição-607A/C, além de conferir susceptibilidade para a AR também confere para o LES na população chinesa, mas não no restante da população asiática (Chen *et al.*, 2012).

Na população brasileira foi encontrado em maior frequência o polimorfismo da IL-18 no alelo C e no genótipo CC posição -105 e está associado com o a susceptibilidade do indivíduo a apresentar quadros mais graves da AR. Este dado sugere que o polimorfismo da IL-18 poderia ser um marcador genético da AR (Angelo *et al.*, 2015).

A IL-31 aparece ainda discretamente nas doenças autoimunes. Os achados mais recentes a associam com o desgaste ósseo na osteoporose (Ginaldi *et al.*, 2015) e em doenças do tecido epitelial (Guarneri *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 2017). Além disso, é estudado que a via de ativação da inflamação a partir da IL-31 é pela cascata de sinalização da STAT1, 3 e 5 na dermatite atópica, e pela MAPK na asma e doenças alérgicas (Di Salvo *et al.*, 2018). Em adição, é sugerido que o gene da IL-31 pode ser um candidato associado à patogênese da AR, porém ainda não há dados que comprovem uma correlação clínica do polimorfismo da IL-31, os níveis séricos da IL-31 com a AR (Yu *et al.*, 2014). Nossos

resultados são interessantes, pois trazem uma correlação negativa dos níveis da IL-31 e a idade dos pacientes AR. É importante determinar qual implicância os níveis séricos da IL-31 pode trazer ao paciente e se o seu potencial pró-inflamatório também está atuante na AR, uma vez que sua ligação ao seu receptor ativa a via STAT3 e MAPK, importantes na patologia da AR.

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado que anti-hipertensivos possuem também um caráter imunomodulador e potencial anti-inflamatório (Liu *et al.*, 2009; Maeda *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014; Sepehri *et al.*, 2016). Entretanto, o potencial desta classe de drogas ainda não foi demonstrado em células mononucleares de pacientes com AR. Outro objetivo deste estudo foi elucidar o potencial imunomodulador de fármacos anti-hipertensivos bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, em PBMCs de pacientes com AR e sua resposta em comparação com os índices de gravidade da doença medido por CDAI e DAS28.

A AR se desenvolve e progride a partir de um desbalanço no sistema imune e nas células de defesa, principalmente pelas células B e as células T CD4+ e seus subgrupos. O subtipo mais envolvido na patogênese da AR são as células Th1 e Th17 e as citocinas inflamatórias produzidas por estas células (Furst e Emery, 2014). Os pacientes com AR geralmente sofrem de doenças cardiovasculares – incidência maior que 70% (Kitas e Gabriel, 2011) e é observado que marcadores imunológicos de inflamação, incluindo a proteína C reativa, são expressos em concentrações mais altas em pacientes AR que possuem alguma DCV (Popkova *et al.*, 2007). Destas DCV, a Hipertensão Arterial Sistêmica na AR, é indicada que seja tratada com bloqueadores da ECA ou por BRAs apresentando bons resultados (De Jong *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012). O risco cardiovascular e a inflamação sistêmica estão associadas com a rápida progressão do espessamento da íntima da carótida em pacientes AR (Del Rincón *et al.*, 2015). Com estes dados, é observada a necessidade de elucidar se esta classe de medicamentos anti-hipertensivos promovem a imunomodulação e se algum deles pode ser o melhor candidato para o tratamento de DCV em pacientes com AR.

Nossos Resultados mostram que a Losartana a 100μM pode reduzir significativamente os níveis de expressão de IFN-γ, IL-6, IL-17F, IL-22 secretadas por PBMCs provenientes de pacientes com AR. Os outros medicamentos testados, Enalapril e Valsartana possuem pouco ou nenhum efeito imunomodulador nestas células, sem afetar a produção de citocinas por elas. Nós mostramos que a Losartana pôde consistentemente reduzir os níveis da citocina IL-17F na dose de 100μM. Em adição, a IL-17F correlacionou com os índices clínicos de atividade da doença DAS28 e CDAI. A Losartana foi capaz de modular a expressão desta citocina naqueles

pacientes em remissão, baixa e moderada atividade da doença, mas o mesmo não foi observado nos índices de alta atividade.

Citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas com o agravamento da doença, bem como com o seu desenvolvimento. Uma destas citocinas é a IL-17. A IL-17A e a IL-17F são reportadas como citocinas que contribuem para a patogênese da AR (Zrioual *et al.*, 2009). Ambas estão presentes na sinóvia e agravam a doença (Furst e Emery, 2014). Adicionalmente a IL-17F apresenta-se como uma citocina chave no desenvolvimento de doenças imunomediadas, como a AR (Paradowska-Gorycka *et al.*, 2010; Hot e Miossec, 2011). Este é um dado interessante, pois além do envolvimento na patogênese da AR, a IL-17 também funciona como uma citocina chave na patogênese a hipertensão arterial sistêmica, induzindo a produção de fatores angiogênicos e migração das células endoteliais dos vasos sanguíneos (Bean *et al.*, 2016). A IL-17A também medeia a lesão renal induzida pela Ang II e regula os transportadores de sódio renal, ativando uma via dependente da quinase 1 regulada por soro e glicocorticoide, e pode causar um desequilíbrio de sódio e água e, aumentando a reabsorção e, portanto, elevar a pressão arterial (Marder *et al.*, 2011; Bean *et al.*, 2016; Norlander *et al.*, 2016). Reduzir os níveis circulantes de IL-17 pode não só trazer benefícios para a AR como poderia também trazer benefícios para aqueles pacientes que sofrem de hipertensão arterial sistêmica.

Nossos resultados mostram uma imunomodulação da Losartana na redução dos níveis de IFN-γ. Além disso, a Losartana também foi capaz de reduzir estatisticamente significativos os níveis de IL-6 na cultura de PBMC de pacientes com AR. IFN-γ e IL-6 são duas citocinas inflamatórias com diversas funções, como promover a proliferação celular e regulação inflamatória do sistema imune. A IL-6 também é utilizada como alvo de tratamento para a AR (Ash e Emery, 2012). A resposta celular a estas duas citocinas ativa a via Janus Kinase/ Transdutor de Sinais e Ativador de Transcrição (JAK/STAT) (Qi *et al.*, 2013). A família IFN está relacionada à patogênese da AR, e isso é bem descrito (Da Rocha Junior *et al.*, 2013; Scarsi *et al.*, 2014). Esta citocina participa certamente na inflamação das articulações, promovendo o recrutamento e a proliferação de células. O IFN-γ também é considerado um marcador para AR (Lübbers *et al.*, 2013). IFN-γ e IL-6, embora distintos, atuam em conjunto e podem ser produzidos em paralelo em um local de inflamação por meio de fatores de transcrição similares, como fator regulador de interferon 1 (IRF-1) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (Yuan *et al.*, 1994). Além disso, a IL-6 também é crucial na patogênese da AR (Calabrese e Rose-John, 2014). Ela está correlacionada com a contagem de articulações inchadas, níveis de

proteína C-reativa e associada à gravidade do DAS28, fator reumatoide e sorologia de anticorpos anti-peptídeos citrulinados (Baillet *et al.*, 2015). Reduzir os níveis de IL-6 então é crucial para um bom prognóstico clínico, assim como observado pela Losartana.

Nossos resultados sugerem que Losartana pôde reduzir significativamente os níveis de IL-22 produzidos por PBMC de pacientes com AR. A IL-22 é uma citocina pleiotrópica e está relacionada com a osteoclastogênese, regulando positivamente a expressão do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL), ativador do receptor, via proteína quinase mitogênica ativada (MAPK) e fator kappa nuclear B – p38 MAPK/NF-κB e JAK-2/STAT -3 - vias de sinalização (Kim *et al.*, 2012). Mas, ao mesmo tempo, as células CD4 + Th22 também estão relacionadas à patogênese da AR, contribuindo para o agravamento dessa doença (Zhao *et al.*, 2013) seja promovendo a proliferação de sinoviócitos (Zhu *et al.*, 2015), e pode se tornas um alvo terapêutico em breve (Xie *et al.*, 2012; Koenders e Van Den Berg, 2015; Xie *et al.*, 2015). Poucos estudos correlacionaram os níveis de IL-22 com a gravidade da AR e possíveis tratamentos para reduzir a produção de citocinas (Da Rocha, L. F. *et al.*, 2012; Da Rocha Junior *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014).

Para todas as citocinas avaliadas, observamos que pacientes com atividade moderada a grave da doença (DAS28> 3,2 e CDAI> 10) respondem em pior eficiência ao tratamento com a Losartana. Pacientes em condições graves provavelmente têm suas células sensibilizadas devido a um tratamento anti-inflamatório e isso torna o estudo *in vitro* mais difícil. Como a AR é uma doença crônica e degenerativa, atualmente é muito difícil recrutar pacientes em condições graves que não estejam tomando nenhum medicamento anti-inflamatório. Uma análise prévia não foi realizada para afirmar se os pacientes que estavam em tratamento com prednisona poderiam ser um fator de influência.

Dos três fármacos anti-hipertensivos testados, a Losartana apresentou os melhores efeitos imunomoduladores em PBMCs de pacientes com AR. Provavelmente, essa redução é devido a um efeito inibitório do Losartana sobre o NF-κB, regulado positivamente em pacientes com AR, modulando citocinas pró-inflamatórias e inflamação nos mesmos (Pattacini *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2014).

7 CONCLUSÃO

- Os níveis séricos de IL-16, IL-18, IL-31 e IL-32 estão aumentados em pacientes portadores de AR em comparação aos controles saudáveis pareados por sexo e idade;
- A IL-16 está correlacionada com o aumento do VSH;
- A IL-31 está correlacionada negativamente com a idade dos pacientes portadores de AR, mas não com os controles saudáveis;
- Pacientes portadores de AR parecem ter os níveis reduzidos de IL-18 e IL-31 quando submetidos ao tratamento com a Leflunomida, mas não com Metotrexato ou Prednisona, isso poderia indicar um melhor tratamento para os pacientes que possuem altos níveis de IL-18 no soro;
- A Losartana modula a expressão de IFN-γ, IL-6, IL-17F e IL-22 a 100μM em PBMCs de pacientes portadores de AR de acordo com a atividade da doença. Além disso, nenhuma atividade imunomoduladora significativa foi observada com Enalapril ou a Valsartana a 100μM na produção destas citocinas, sugerindo que a Losartana poderia ser uma melhor opção para o tratamento da HAS em pacientes portadores AR;
- A Losartana, mas não Enalapril e a Valsartana, parece ter efeito sobre a inibição do fator de transcrição NFκB em células U937, o que leva a uma baixa produção de fatores inflamatórios;

8 PERSPECTIVAS

- Determinar os níveis de expressão de NFκB, STAT3, MAPK e AKT após tratamento com Enalapril, Losartana e Valsartana em células U937 para determinar qual é a via de atuação da modulação da Losartana.

REFERÊNCIAS

ABU AL FADL, E. M.; FATTOUH, M.; ALLAM, A. A. High IL-23 level is a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. **Egypt J Immunol,** v. 20, n. 2, p. 85-92, 2013. ISSN 1110-4902. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24617049 >.

ALBUQUERQUE, D. et al. The ACE inhibitors enalapril and captopril modulate cytokine responses in Balb/c and C57Bl/6 normal mice and increase CD4(+)CD103(+)CD25(negative) splenic T cell numbers. **Cell Immunol,** v. 260, n. 2, p. 92-7, 2010. ISSN 1090-2163. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854435 >.

ALEMAO, E. et al. Treating to the Target of Das28 < 2.6 in Rheumatoid Arthritis: the Impact of Efficacy on Cost Effectiveness. **Value Health,** v. 17, n. 7, p. A378-9, Nov 2014. ISSN 1524-4733. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200834 >.

ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis Rheum,** v. 62, n. 9, p. 2569-81, Sep 2010. ISSN 1529-0131. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20872595 >.

AMATYA, N.; GARG, A. V.; GAFFEN, S. L. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. **Trends Immunol,** v. 38, n. 5, p. 310-322, May 2017. ISSN 1471-4981. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28254169 >.

ANDERSON, A. E. et al. IL-6-driven STAT signalling in circulating CD4+ lymphocytes is a marker for early anticitrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis,** v. 75, n. 2, p. 466-73, Feb 2016. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25649145 >.

ANGELO, H. D. et al. Interleukin-18, interleukin-12B and interferon-γ gene polymorphisms in Brazilian patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. **Tissue Antigens,** v. 86, n. 4, p. 276-8, Oct 2015. ISSN 1399-0039. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26302971 >.

AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunol Rev,** v. 223, p. 20-38, Jun 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18613828 >.

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum,** v. 31, n. 3, p. 315-24, Mar 1988. ISSN 0004-3591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796 >.

ASH, Z.; EMERY, P. The role of tocilizumab in the management of rheumatoid arthritis. **Expert Opin Biol Ther,** v. 12, n. 9, p. 1277-89, Sep 2012. ISSN 1744-7682. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22849354 >.

AWASTHI, A.; KUCHROO, V. K. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. **Int Immunol,** v. 21, n. 5, p. 489-98, May 2009. ISSN 1460-2377. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261692 >.

AZEVEDO, A. F. et al. Quality of life of patients with rheumatoid arthritis under biological therapy. **Rev Assoc Med Bras (1992),** v. 61, n. 2, p. 126-31, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 1806-9282. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26107361 >.

AZIZI, G.; YAZDANI, R.; MIRSHAFIEY, A. Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge. **Eur Ann Allergy Clin Immunol,** v. 47, n. 4, p. 108-17, Jul 2015. ISSN 1764-1489. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26159476 >.

BAAN, H. et al. We should not forget the foot: relations between signs and symptoms, damage, and function in rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol,** v. 30, n. 11, p. 1475-9, Nov 2011. ISSN 1434-9949. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21614474 >.

BAEK, Y. S. et al. Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. **BMC Immunol,** v. 10, p. 18, Apr 2009. ISSN 1471-2172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19341462 >.

BAETEN, D. L.; KUCHROO, V. K. How Cytokine networks fuel inflammation: Interleukin-17 and a tale of two autoimmune diseases. **Nat Med,** v. 19, n. 7, p. 824-5, Jul 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836225 >.

BAILLET, A. et al. Evaluation of serum interleukin-6 level as a surrogate marker of synovial inflammation and as a factor of structural progression in early rheumatoid arthritis: results from a

French national multicenter cohort. **Arthritis Care Res (Hoboken),** v. 67, n. 7, p. 905-12, Jul 2015. ISSN 2151-4658. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384758 >.
BASSO, A. S.; CHEROUTRE, H.; MUCIDA, D. More stories on Th17 cells. **Cell Res,** v. 19, n. 4, p. 399-411, Apr 2009. ISSN 1748-7838. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255592 >.
BAYLEY, R. et al. The autoimmune-associated genetic variant PTPN22 R620W enhances neutrophil activation and function in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. **Ann Rheum Dis,** v. 74, n. 8, p. 1588-95, Aug 2015. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24665115 >.
BEAN, C. et al. Inhibition of T-cell activation attenuates hypertension, TNFα, IL-17, and blood-brain barrier permeability in pregnant rats with angiogenic imbalance. **Am J Reprod Immunol,** v. 76, n. 4, p. 272-9, Oct 2016. ISSN 1600-0897. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27476638 >.
BENICKY, J. et al. Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. **Cell Mol Neurobiol,** v. 29, n. 6-7, p. 781-92, Sep 2009. ISSN 1573-6830. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259805 >.
BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature,** v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648838 >.
BOUCELMA, M. et al. Cardiovascular risk and lupus disease. **Int Angiol,** v. 30, n. 1, p. 18-24, Feb 2011. ISSN 1827-1839. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248669 >.
BREDEMEIER, M.; DE OLIVEIRA, F. K.; ROCHA, C. M. Low- versus high-dose rituximab for rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Arthritis Care Res (Hoboken),** v. 66, n. 2, p. 228-35, Feb 2014. ISSN 2151-4658. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23983134 >.
BUCCIONE, C. et al. Role of interferon regulatory factor 1 in governing Treg depletion, Th1 polarization, inflammasome activation and antitumor efficacy of cyclophosphamide. **Int J Cancer,** v. 142, n. 5, p. 976-987, Mar 2018. ISSN 1097-0215. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28975621 >.
BULPITT, K. J. Biologic therapies in rheumatoid arthritis. **Curr Rheumatol Rep,** v. 1, n. 2, p. 157-63, Dec 1999. ISSN 1523-3774. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123030 >.
BYNG-MADDICK, R.; EHRENSTEIN, M. R. The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford),** v. 54, n. 5, p. 768-75, May 2015. ISSN 1462-0332. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25667434 >.
CAI, L. P. et al. Association of IL-18 promoter gene polymorphisms with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Mol Biol Rep,** v. 41, n. 12, p. 8211-7, Dec 2014. ISSN 1573-4978. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25192895 >.
CALABRESE, L. H.; ROSE-JOHN, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Nat Rev Rheumatol,** v. 10, n. 12, p. 720-7, Dec 2014. ISSN 1759-4804. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136784 >.
CALABRESI, E. et al. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol,** v. 36, n. 2, p. 175-184, 2018 Mar-Apr 2018. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29716677 >.
CAMPO, G. M. et al. 6-Mer hyaluronan oligosaccharides increase IL-18 and IL-33 production in mouse synovial fibroblasts subjected to collagen-induced arthritis. **Innate Immun,** v. 18, n. 5, p. 675-84, Oct 2012. ISSN 1753-4267. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278935 >.
CAPETTINI, L. S. et al. Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. **Curr Pharm Des,** v. 18, n. 7, p. 963-70, 2012. ISSN 1873-4286. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22283774 >.
CAVALCANTI, N. G. et al. Cytokine Profile in Gout: Inflammation Driven by IL-6 and IL-18? **Immunol Invest,** v. 45, n. 5, p. 383-95, Jul 2016. ISSN 1532-4311. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27219123 >.
CHABAUD, M. et al. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res,** v. 3, n. 3, p. 168-77, 2001. ISSN 1465-9905. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11299057 >.

CHAI, R.; LIU, B.; QI, F. The significance of the levels of IL-4, IL-31 and TLSP in patients with asthma and/or rhinitis. **Immunotherapy,** v. 9, n. 4, p. 331-337, 03 2017. ISSN 1750-7448. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28303765 >.
CHANG, S. H.; DONG, C. IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. **Cytokine,** v. 46, n. 1, p. 7-11, Apr 2009. ISSN 1096-0023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19233684 >.
CHEN, S. et al. Association of IL-18 polymorphisms with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Asian populations: a meta-analysis. **BMC Med Genet,** v. 13, p. 107, Nov 2012. ISSN 1471-2350. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153245 >.
CHO, K. A. et al. Interleukin-17 and Interleukin-22 Induced Proinflammatory Cytokine Production in Keratinocytes via Inhibitor of Nuclear Factor κB Kinase-α Expression. **Ann Dermatol,** v. 24, n. 4, p. 398-405, Nov 2012. ISSN 2005-3894. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197904 >.
CHO, M. L. et al. IL-17 induces the production of IL-16 in rheumatoid arthritis. **Exp Mol Med,** v. 40, n. 2, p. 237-45, Apr 2008. ISSN 1226-3613. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18446062 >.
CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med,** v. 344, n. 12, p. 907-16, Mar 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259725 >.
CHUNG, C. P. et al. Prevalence of traditional modifiable cardiovascular risk factors in patients with rheumatoid arthritis: comparison with control subjects from the multi-ethnic study of atherosclerosis. **Semin Arthritis Rheum,** v. 41, n. 4, p. 535-44, Feb 2012. ISSN 1532-866X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22340996 >.
CITERA, G. et al. Influence of HLA-DR alleles on rheumatoid arthritis: susceptibility and severity in Argentine patients. **J Rheumatol,** v. 28, n. 7, p. 1486-91, Jul 2001. ISSN 0315-162X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469451 >.
CLAVEL, G.; THIOLAT, A.; BOISSIER, M. C. Interleukin newcomers creating new numbers in rheumatology: IL-34 to IL-38. **Joint Bone Spine,** v. 80, n. 5, p. 449-53, Oct 2013. ISSN 1778-7254. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849463 >.
COLIN, E. M. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum,** v. 62, n. 1, p. 132-42, Jan 2010. ISSN 0004-3591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20039421 >.
COMMITTEE, E. S. O. H.-E. S. O. C. G. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. **J Hypertens,** v. 21, n. 6, p. 1011-53, Jun 2003. ISSN 0263-6352. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12777938 >.
COSTANZA, M. et al. Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. **Autoimmun Rev,** v. 14, n. 3, p. 223-30, Mar 2015. ISSN 1873-0183. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25462579 >.
CROWLEY, S. D.; RUDEMILLER, N. P. Immunologic Effects of the Renin-Angiotensin System. **J Am Soc Nephrol,** v. 28, n. 5, p. 1350-1361, May 2017. ISSN 1533-3450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28151411 >.
CUCAK, H. et al. Enalapril treatment increases T cell number and promotes polarization towards M1-like macrophages locally in diabetic nephropathy. **Int Immunopharmacol,** v. 25, n. 1, p. 30-42, Mar 2015. ISSN 1878-1705. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25598292 >.
CUCHACOVICH, M. et al. Clinical parameters and biomarkers for anti-TNF treatment prognosis in rheumatoid arthritis patients. **Clin Rheumatol,** v. 33, n. 12, p. 1707-14, Dec 2014. ISSN 1434-9949. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085274 >.
CUCHACOVICH, R.; ESPINOZA, L. R. Does TNF-alpha blockade play any role in cardiovascular risk among rheumatoid arthritis (RA) patients? **Clin Rheumatol,** v. 28, n. 10, p. 1217-20, Oct 2009. ISSN 1434-9949. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517156 >.
CUSH, J. J.; KAVANAUGH, A. F. Biologic interventions in rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am,** v. 21, n. 3, p. 797-816, Aug 1995. ISSN 0889-857X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8619100 >.

DA MOTA, L. M. et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol,** v. 52, n. 2, p. 152-74, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 1809-4570. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460407 >.
DA ROCHA JUNIOR, L. F. et al. Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. **Biomed Res Int,** v. 2013, p. 926060, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078927 >.
DA ROCHA, L. F. et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. **J Rheumatol,** v. 39, n. 7, p. 1320-5, Jul 2012. ISSN 0315-162X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589261 >.
DA ROCHA, L. F., JR. et al. Increased Serum Interleukin 22 in Patients with Rheumatoid Arthritis and Correlation with Disease Activity. **Journal of Rheumatology,** v. 39, n. 7, p. 1320-1325, JUL 2012 2012a. ISSN 0315-162X.
_____. Interleukin 22, a Potential Therapeutic Target for Rheumatoid Arthritis Reply. **Journal of Rheumatology,** v. 39, n. 11, p. 2221, NOV 2012 2012b. ISSN 0315-162X.
DAI, S. M.; NISHIOKA, K.; YUDOH, K. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha. **Ann Rheum Dis,** v. 63, n. 11, p. 1379-86, Nov 2004. ISSN 0003-4967. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479886 >.
DANKERS, M. K. et al. The HLA-DR phenotype of the responder is predictive of humoral response against HLA class I antigens. **Hum Immunol,** v. 65, n. 1, p. 13-9, Jan 2004. ISSN 0198-8859. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14700591 >.
DAVIDI, S. et al. The antiangiogenic role of the pro-inflammatory cytokine interleukin-31. **Oncotarget,** v. 8, n. 10, p. 16430-16444, Mar 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28147314 >.
DE AZEVEDO, A. B.; FERRAZ, M. B.; CICONELLI, R. M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Value Health,** v. 11, n. 5, p. 869-77, 2008 Sep-Oct 2008. ISSN 1524-4733. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18489511 >.
DE GASPARO, M.; WHITEBREAD, S. Binding of valsartan to mammalian angiotensin AT1 receptors. **Regul Pept,** v. 59, n. 3, p. 303-11, Nov 1995. ISSN 0167-0115. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577935 >.
DE JONG, H. J. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers and the risk of developing rheumatoid arthritis in antihypertensive drug users. **Pharmacoepidemiol Drug Saf,** v. 21, n. 8, p. 835-43, Aug 2012. ISSN 1099-1557. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674737 >.
DEANE, K. D. et al. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol,** v. 31, n. 1, p. 3-18, Feb 2017. ISSN 1532-1770. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29221595 >.
DEL RINCÓN, I. et al. Systemic inflammation and cardiovascular risk factors predict rapid progression of atherosclerosis in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis,** v. 74, n. 6, p. 1118-23, Jun 2015. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24845391 >.
DEROSA, G. et al. Different actions of losartan and ramipril on adipose tissue activity and vascular remodeling biomarkers in hypertensive patients. **Hypertens Res,** v. 34, n. 1, p. 145-51, Jan 2011. ISSN 1348-4214. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107327 >.
DI SALVO, E. et al. IL-33/IL-31 Axis: A Potential Inflammatory Pathway. **Mediators Inflamm,** v. 2018, p. 3858032, 2018. ISSN 1466-1861. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29713240 >.
DI SANTE, G. et al. Collagen Specific T-Cell Repertoire and HLA-DR Alleles: Biomarkers of Active Refractory Rheumatoid Arthritis. **EBioMedicine,** v. 2, n. 12, p. 2037-45, Dec 2015. ISSN 2352-3964. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26844284 >.
DIOMEDE, F. et al. MyD88/ERK/NFkB pathways and pro-inflammatory cytokines release in periodontal ligament stem cells stimulated by Porphyromonas gingivalis. **Eur J Histochem,** v. 61, n. 2, p. 2791, May 2017. ISSN 2038-8306. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28735521 >.

DOS SANTOS, J. B. et al. Comparative effectiveness of adalimumab and etanercept for rheumatoid arthritis in the Brazilian Public Health System. **J Comp Eff Res,** v. 5, n. 6, p. 539-549, Nov 2016. ISSN 2042-6313. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27641309 >.
DOUBRAWA, E. et al. Use of infliximab in a patient with rheumatoid arthritis and chronic hepatitis B. **Rev Bras Reumatol,** v. 52, n. 4, p. 653-5, Aug 2012. ISSN 1809-4570. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885430 >.
DOUGADOS, M. Comorbidities in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol,** v. 28, n. 3, p. 282-8, May 2016. ISSN 1531-6963. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27027814 >.
DOUGADOS, M. et al. Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). **Ann Rheum Dis,** v. 73, n. 1, p. 62-8, Jan 2014. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24095940 >.
DURAND, S. [Treatment of rheumatoid arthritis: 200 recommendations on the use of methotrexate]. **Perspect Infirm,** v. 6, n. 3, p. 33-4, 2009 May-Jun 2009. ISSN 1708-1890. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20120318 >.
EDUKULLA, R. et al. Th2 Cytokines Augment IL-31/IL-31RA Interactions via STAT6-dependent IL-31RA Expression. **J Biol Chem,** v. 290, n. 21, p. 13510-20, May 2015. ISSN 1083-351X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25847241 >.
ENGLAND, B. R. et al. Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications. **BMJ,** v. 361, p. k1036, Apr 2018. ISSN 1756-1833. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29685876 >.
ETHGEN, O. et al. What do we know about the safety of corticosteroids in rheumatoid arthritis? **Curr Med Res Opin,** v. 29, n. 9, p. 1147-60, Sep 2013. ISSN 1473-4877. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790244 >.
FAVILLI, F. et al. IL-18 activity in systemic lupus erythematosus. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1173, p. 301-9, Sep 2009. ISSN 1749-6632. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19758166 >.
FENDRICH, V. et al. Enalapril and ASS inhibit tumor growth in a transgenic mouse model of islet cell tumors. **Endocr Relat Cancer,** v. 21, n. 5, p. 813-24, Oct 2014. ISSN 1479-6821. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121552 >.
FERGUSON, R. K. et al. Effects of enalapril, a new converting enzyme inhibitor, in hypertension. **Clin Pharmacol Ther,** v. 32, n. 1, p. 48-53, Jul 1982. ISSN 0009-9236. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6282527 >.
FERRACCIOLI, G. et al. Interleukin-1β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. **Mol Med,** v. 16, n. 11-12, p. 552-7, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1528-3658. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683549 >.
FERRARIO, C. M. The role of angiotensin antagonism in stroke prevention in patients with hypertension: focus on losartan. **Curr Med Res Opin,** v. 20, n. 11, p. 1797-804, Nov 2004. ISSN 0300-7995. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537480 >.
FONTECCHIO, G. et al. Genetic predisposition to rheumatoid arthritis in a Tuscan (Italy) ancient human remain. **Int J Immunopathol Pharmacol,** v. 20, n. 1, p. 103-9, 2007 Jan-Mar 2007. ISSN 0394-6320. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346433 >.
FORSLIND, K. et al. Does digital X-ray radiogrammetry have a role in identifying patients at increased risk for joint destruction in early rheumatoid arthritis? **Arthritis Res Ther,** v. 14, n. 5, p. R219, Oct 2012. ISSN 1478-6362. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068060 >.
FRISELL, T.; SAEVARSDOTTIR, S.; ASKLING, J. Family history of rheumatoid arthritis: an old concept with new developments. **Nat Rev Rheumatol,** v. 12, n. 6, p. 335-43, Jun 2016. ISSN 1759-4804. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27098907 >.
FURST, D. E.; EMERY, P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. **Rheumatology (Oxford),** v. 53, n. 9, p. 1560-9, Sep 2014. ISSN 1462-0332. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402580 >.

FURUE, M. et al. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. **Allergy,** v. 73, n. 1, p. 29-36, Jan 2018. ISSN 1398-9995. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28670717 >.
GARCÍA, V. E. et al. Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. **J Immunol,** v. 167, n. 10, p. 5719-24, Nov 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698444 >.
GIBOFSKY, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. **Am J Manag Care,** v. 18, n. 13 Suppl, p. S295-302, Dec 2012. ISSN 1936-2692. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327517 >.
GINALDI, L. et al. Increased levels of interleukin 31 (IL-31) in osteoporosis. **BMC Immunol,** v. 16, p. 60, Oct 2015. ISSN 1471-2172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26449657 >.
GOELDNER, I. et al. Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies with extra-articular manifestations, gender, and tabagism in rheumatoid arthritis patients from southern Brazil. **Clin Rheumatol,** v. 30, n. 7, p. 975-80, Jul 2011. ISSN 1434-9949. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340496 >.
GOEMAERE, S. et al. Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition. **J Rheumatol,** v. 17, n. 12, p. 1620-2, Dec 1990. ISSN 0315-162X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2084234 >.
GONZALEZ, A. et al. Do cardiovascular risk factors confer the same risk for cardiovascular outcomes in rheumatoid arthritis patients as in non-rheumatoid arthritis patients? **Ann Rheum Dis,** v. 67, n. 1, p. 64-9, Jan 2008. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517756 >.
GONZALEZ-GAY, M. A. et al. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. **Biomed Pharmacother,** v. 60, n. 10, p. 673-7, Dec 2006. ISSN 0753-3322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049201 >.
GRACIE, J. A. et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest,** v. 104, n. 10, p. 1393-401, Nov 1999. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562301 >.
GUARNERI, F. et al. IL-31 and IL-33 circulating levels in allergic contact dermatitis. **Eur Ann Allergy Clin Immunol,** v. 47, n. 5, p. 156-8, Sep 2015. ISSN 1764-1489. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26357000 >.
GUO, G.; CHENG, X.; FU, R. Losartan Inhibits Nuclear Factor-κB Activation Induced by Small, Dense LDL Cholesterol Particles in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Curr Ther Res Clin Exp,** v. 76, p. 17-20, Dec 2014. ISSN 0011-393X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031662 >.
GUO, J.; LI, Z. Genetic markers and clinical relevance in rheumatoid arthritis. **Int J Rheum Dis,** v. 19, n. 2, p. 109-13, Feb 2016. ISSN 1756-185X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26620943 >.
GUO, S. et al. Renin-angiotensin system blockade is renoprotective in immune complex-mediated glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol,** v. 19, n. 6, p. 1168-76, Jun 2008. ISSN 1533-3450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337487 >.
GURRAM, V. C. et al. Genetic polymorphism of interleukin-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients from southern India. **J Clin Diagn Res,** v. 8, n. 6, p. SC01-4, Jun 2014. ISSN 2249-782X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121046 >.
HARNETT, J. et al. Real-world evaluation of TNF-inhibitor utilization in rheumatoid arthritis. **J Med Econ,** v. 19, n. 2, p. 91-102, 2016. ISSN 1941-837X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401963 >.
HAROON, N. et al. Impact of rheumatoid arthritis on quality of life. **Mod Rheumatol,** v. 17, n. 4, p. 290-5, 2007. ISSN 1439-7595. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17694261 >.
HARRIS, E. D. The rationale for combination therapy of rheumatoid arthritis based on pathophysiology. **J Rheumatol Suppl,** v. 44, p. 2-4, Mar 1996. ISSN 0380-0903. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8833043 >.

HELMICK, C. G. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. **Arthritis Rheum,** v. 58, n. 1, p. 15-25, Jan 2008. ISSN 0004-3591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18163481 >.
HOT, A.; MIOSSEC, P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. **Ann Rheum Dis,** v. 70, n. 5, p. 727-32, May 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345813 >.
HU, Y. et al. Long-term dietary quality and risk of developing rheumatoid arthritis in women. **Ann Rheum Dis,** v. 76, n. 8, p. 1357-1364, Aug 2017. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28137914 >.
HUANG, W. et al. Sirt1 overexpression protects murine osteoblasts against TNF-α-induced injury in vitro by suppressing the NF-κB signaling pathway. **Acta Pharmacol Sin,** v. 33, n. 5, p. 668-74, May 2012. ISSN 1745-7254. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22447223 >.
HUSSAIN, W. et al. From Symptoms to Diagnosis: An Observational Study of the Journey of Rheumatoid Arthritis Patients in Saudi Arabia. **Oman Med J,** v. 31, n. 1, p. 29-34, Jan 2016. ISSN 1999-768X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816566 >.
HWANG, S. Y. et al. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. **Arthritis Res Ther,** v. 6, n. 2, p. R120-8, 2004. ISSN 1478-6362. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059275 >.
HYMOWITZ, S. G. et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. **EMBO J,** v. 20, n. 19, p. 5332-41, Oct 2001. ISSN 0261-4189. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574464 >.
IKEUCHI, H. et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. **Arthritis Rheum,** v. 52, n. 4, p. 1037-46, Apr 2005. ISSN 0004-3591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15818686 >.
ISOMÄKI, P. et al. The activity of JAK-STAT pathways in rheumatoid arthritis: constitutive activation of STAT3 correlates with interleukin 6 levels. **Rheumatology (Oxford),** v. 54, n. 6, p. 1103-13, Jun 2015. ISSN 1462-0332. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25406356 >.
ITOH, Y. Metalloproteinases: potential therapeutic targets for rheumatoid arthritis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets,** v. 15, n. 3, p. 216-22, 2015. ISSN 2212-3873. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772173 >.
ITTY, S. et al. Anti-cyclic citrullinated peptide, rheumatoid factor, and ocular symptoms typical of rheumatoid arthritis. **Trans Am Ophthalmol Soc,** v. 106, p. 75-81; discussion 81-3, 2008. ISSN 1545-6110. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19277223 >.
IWAKURA, Y. et al. Functional specialization of interleukin-17 family members. **Immunity,** v. 34, n. 2, p. 149-62, Feb 2011. ISSN 1097-4180. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349428 >.
IWASHITA, M. et al. Valsartan restores inflammatory response by macrophages in adipose and hepatic tissues of LPS-infused mice. **Adipocyte,** v. 2, n. 1, p. 28-32, Jan 2013. ISSN 2162-3945. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23700549 >.
JOOSTEN, L. A. et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 103, n. 9, p. 3298-303, Feb 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16492735 >.
KARLSON, E. W. et al. Cumulative association of 22 genetic variants with seropositive rheumatoid arthritis risk. **Ann Rheum Dis,** v. 69, n. 6, p. 1077-85, Jun 2010. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233754 >.
KAWAGUCHI, M. et al. Induction of C-X-C chemokines, growth-related oncogene alpha expression, and epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78 by ML-1 (interleukin-17F) involves activation of Raf1-mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 307, n. 3, p. 1213-20, Dec 2003. ISSN 0022-3565. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557379 >.
KEEN, H. I.; CONAGHAN, P. G.; TETT, S. E. Safety evaluation of leflunomide in rheumatoid arthritis. **Expert Opin Drug Saf,** v. 12, n. 4, p. 581-8, Jul 2013. ISSN 1744-764X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23668332 >.

KELLEY, K. W.; WEIGENT, D. A.; KOOIJMAN, R. Protein hormones and immunity. **Brain Behav Immun,** v. 21, n. 4, p. 384-92, May 2007. ISSN 0889-1591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17198749 >.
KHNABA, D. et al. Sexual dysfunction and its determinants in Moroccan women with rheumatoid arthritis. **Pan Afr Med J,** v. 24, p. 16, 2016. ISSN 1937-8688. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27583080 >.
KIM, C. H. Migration and function of Th17 cells. **Inflamm Allergy Drug Targets,** v. 8, n. 3, p. 221-8, Jul 2009. ISSN 2212-4055. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601882 >.
KIM, J. A.; BERLINER, J. A.; NADLER, J. L. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 226, n. 3, p. 862-8, Sep 1996. ISSN 0006-291X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8831702 >.
KIM, K. et al. Imputing Variants in HLA-DR Beta Genes Reveals That HLA-DRB1 Is Solely Associated with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. **PLoS One,** v. 11, n. 2, p. e0150283, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26919467 >.
KIM, K. W. et al. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum,** v. 64, n. 4, p. 1015-23, Apr 2012. ISSN 1529-0131. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034096 >.
KIRABO, A. A new paradigm of sodium regulation in inflammation and hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 313, n. 6, p. R706-R710, Dec 2017. ISSN 1522-1490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28931546 >.
KIRKHAM, B. W. et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). **Arthritis Rheum,** v. 54, n. 4, p. 1122-31, Apr 2006. ISSN 0004-3591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16572447 >.
KITAS, G. D.; GABRIEL, S. E. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. **Ann Rheum Dis,** v. 70, n. 1, p. 8-14, Jan 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109513 >.
KLIMIUK, P. A. et al. The changes in serum chemokines following leflunomide therapy in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol,** v. 28, n. 1, p. 17-21, Jan 2009. ISSN 1434-9949. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18663553 >.
KOCHI, Y. Genetic background of tolerance breakdown in rheumatoid arthritis. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi,** v. 33, n. 2, p. 48-56, 2010. ISSN 1349-7413. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453439 >.
KOENDERS, M. I.; VAN DEN BERG, W. B. Novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis. **Trends Pharmacol Sci,** v. 36, n. 4, p. 189-95, Apr 2015. ISSN 1873-3735. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732812 >.
KOIKE, T. Treatment of rheumatoid arthritis by molecular-targeted agents: efficacy and limitations. **J Orthop Sci,** v. 20, n. 6, p. 951-7, Nov 2015. ISSN 1436-2023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26404390 >.
KON, V.; LINTON, M. F.; FAZIO, S. Atherosclerosis in chronic kidney disease: the role of macrophages. **Nat Rev Nephrol,** v. 7, n. 1, p. 45-54, Jan 2011. ISSN 1759-507X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21102540 >.
KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol,** v. 27, p. 485-517, 2009. ISSN 0732-0582. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132915 >.
KOTAKE, S. et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **J Clin Invest,** v. 103, n. 9, p. 1345-52, May 1999. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225978 >.
KOZERA, L.; ANDREWS, J.; MORGAN, A. W. Cardiovascular risk and rheumatoid arthritis--the next step: differentiating true soluble biomarkers of cardiovascular risk from surrogate measures of inflammation. **Rheumatology (Oxford),** v. 50, n. 11, p. 1944-54, Nov 2011. ISSN 1462-0332. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752870 >.
KRASSELT, M.; BAERWALD, C. Efficacy and safety of modified-release prednisone in patients with rheumatoid arthritis. **Drug Des Devel Ther,** v. 10, p. 1047-58, 2016. ISSN 1177-8881. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022244 >.

KREYMBORG, K. et al. IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol,** v. 179, n. 12, p. 8098-104, Dec 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056351 >.
KUMAGAI, S. [Optimal Treatment for Rheumatoid Arthritis with Companion Diagnostics]. **Rinsho Byori,** v. 63, n. 11, p. 1328-35, Nov 2015. ISSN 0047-1860. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26995880 >.
LABERGE, S. et al. Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. **J Immunol,** v. 156, n. 1, p. 310-5, Jan 1996. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598478 >.
_____. Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol,** v. 102, n. 4 Pt 1, p. 645-50, Oct 1998. ISSN 0091-6749. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802374 >.
LANDEWÉ, R. B.; BREEDVELD, F. C.; DIJKMANS, B. A. Methotrexate treatment and mortality in rheumatoid arthritis. **Lancet,** v. 360, n. 9339, p. 1095-6; author reply 1097-8, Oct 2002. ISSN 0140-6736. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384009 >.
LANGE, M. et al. Interleukin-31 Polymorphisms and Serum IL-31 Level in Patients with Mastocytosis: Correlation with Clinical Presen-tation and Pruritus. **Acta Derm Venereol,** v. 97, n. 1, p. 47-53, 01 2017. ISSN 1651-2057. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27276346 >.
LARD, L. R. et al. Enhanced concentrations of interleukin 16 are associated with joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol,** v. 31, n. 1, p. 35-9, Jan 2004. ISSN 0315-162X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14705216 >.
LEE, C. et al. Enalapril inhibits nuclear factor-κB signaling in intestinal epithelial cells and peritoneal macrophages and attenuates experimental colitis in mice. **Life Sci,** v. 95, n. 1, p. 29-39, Jan 2014. ISSN 1879-0631. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239644 >.
LEE, H. J. et al. The effects of an orally administered probiotic on sulfasalazine metabolism in individuals with rheumatoid arthritis: a preliminary study. **Int J Rheum Dis,** v. 13, n. 1, p. 48-54, Feb 2010. ISSN 1756-185X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374384 >.
LEE, S. Y. et al. Interleukin-17 increases the expression of Toll-like receptor 3 via the STAT3 pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Immunology,** v. 141, n. 3, p. 353-61, Mar 2014. ISSN 1365-2567. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24708416 >.
LI, L. L. et al. Association of IL-18 polymorphisms with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Genet Mol Res,** v. 15, n. 1, Jan 2016. ISSN 1676-5680. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26909913 >.
LI, N. et al. Pathologic finding of increased expression of interleukin-17 in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. **Int J Clin Exp Pathol,** v. 6, n. 7, p. 1375-9, 2013. ISSN 1936-2625. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826419 >.
LI, X. et al. Valsartan Attenuates KIR2.1 by Downregulating the Th1 Immune Response in Rats Following Myocardial Infarction. **J Cardiovasc Pharmacol,** v. 67, n. 3, p. 252-9, Mar 2016. ISSN 1533-4023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26566151 >.
LIM, D. T. et al. Cardiovascular risk and the use of biologic agents in rheumatoid arthritis. **Curr Rheumatol Rep,** v. 16, n. 11, p. 459, Nov 2014. ISSN 1534-6307. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315196 >.
LIM, S. S.; CONN, D. L. The use of low-dose prednisone in the management of rheumatoid arthritis. **Bull Rheum Dis,** v. 50, n. 12, p. 1-4, 2001. ISSN 0007-5248. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12386945 >.
LINDHARDSEN, J. et al. The risk of myocardial infarction in rheumatoid arthritis and diabetes mellitus: a Danish nationwide cohort study. **Ann Rheum Dis,** v. 70, n. 6, p. 929-34, Jun 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21389043 >.
LITINSKY, I. et al. The effects of leflunomide on clinical parameters and serum levels of IL-6, IL-10, MMP-1 and MMP-3 in patients with resistant rheumatoid arthritis. **Cytokine,** v. 33, n. 2, p. 106-10, Jan 2006. ISSN 1043-4666. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487722 >.
LIU, F. L. et al. Interleukin (IL)-23 p19 expression induced by IL-1beta in human fibroblast-like synoviocytes with rheumatoid arthritis via active nuclear factor-kappaB and AP-1 dependent pathway.

Rheumatology (Oxford), v. 46, n. 8, p. 1266-73, Aug 2007. ISSN 1462-0324. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569750 >.
LIU, J. et al. Losartan inhibits conventional dendritic cell maturation and Th1 and Th17 polarization responses: Novel mechanisms of preventive effects on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Int J Mol Med,** v. 29, n. 2, p. 269-76, Feb 2012. ISSN 1791-244X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020765 >.
LIU, X. et al. Effects of angiotensin-II receptor blockers on experimental autoimmune myocarditis. **Int J Cardiol,** v. 137, n. 3, p. 282-8, Nov 2009. ISSN 1874-1754. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19896742 >.
LIU, Z. et al. Treatment with telmisartan/rosuvastatin combination has a beneficial synergistic effect on ameliorating Th17/Treg functional imbalance in hypertensive patients with carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis,** v. 233, n. 1, p. 291-9, Mar 2014. ISSN 1879-1484. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495792 >.
LOSCERTALES, H. R. et al. Stability of enalapril repackaged into monitored dosage system. **Curr Med Res Opin,** v. 31, n. 10, p. 1915-7, 2015. ISSN 1473-4877. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26390801 >.
LOUBAKI, L. et al. Co-culture of human bronchial fibroblasts and CD4+ T cells increases Th17 cytokine signature. **PLoS One,** v. 8, n. 12, p. e81983, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24349168 >.
LYDYARD, P. M.; EDWARDS, J. C. The pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol,** v. 12 Suppl 11, p. S55-8, 1994 Nov-Dec 1994. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768054 >.
LÜBBERS, J. et al. The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis,** v. 72, n. 5, p. 776-80, May 2013. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434571 >.
MA, T. K. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. **Br J Pharmacol,** v. 160, n. 6, p. 1273-92, Jul 2010. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20590619 >.
MADHUR, M. S. et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. **Hypertension,** v. 55, n. 2, p. 500-7, Feb 2010. ISSN 1524-4563. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20038749 >.
MAEDA, A. et al. Immunosuppressive effect of angiotensin receptor blocker on stimulation of mice CTLs by angiotensin II. **Int Immunopharmacol,** v. 9, n. 10, p. 1183-8, Sep 2009. ISSN 1878-1705. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540938 >.
MAHMOUDI, M. et al. New insights to the mechanisms underlying atherosclerosis in rheumatoid arthritis. **Int J Rheum Dis,** v. 20, n. 3, p. 287-297, Mar 2017. ISSN 1756-185X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28205331 >.
MAINI, R. N. et al. TNF-alpha in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy. **Clin Exp Rheumatol,** v. 11 Suppl 8, p. S173-5, 1993 Mar-Apr 1993. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391952 >.
MARDER, W. et al. Interleukin 17 as a novel predictor of vascular function in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis,** v. 70, n. 9, p. 1550-5, Sep 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21727237 >.
MARWA, O. S. et al. Association of IL17A and IL17F genes with rheumatoid arthritis disease and the impact of genetic polymorphisms on response to treatment. **Immunol Lett,** v. 183, p. 24-36, Mar 2017. ISSN 1879-0542. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143790 >.
MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol,** v. 7, n. 6, p. 429-42, Jun 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525752 >.
MCMURRAY, R. W. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. **Int Immunopharmacol,** v. 1, n. 6, p. 995-1008, Jun 2001. ISSN 1567-5769. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11407318 >.
MENG, K. et al. Valsartan Attenuates Atherosclerosis via Upregulating the Th2 Immune Response in Prolonged Angiotensin II-Treated ApoE(-/-) Mice. **Mol Med,** v. 21, p. 143-53, Feb 2015. ISSN 1528-3658. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685964 >.

MERINO, A. et al. Losartan prevents the development of the pro-inflammatory monocytes CD14+CD16+ in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant,** v. 27, n. 7, p. 2907-12, Jul 2012. ISSN 1460-2385. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247233 >.
MICHAUD, K.; WOLFE, F. Comorbidities in rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol,** v. 21, n. 5, p. 885-906, Oct 2007. ISSN 1521-6942. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17870034 >.
MILOVANOVIC, M. et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. **Immunol Res,** v. 52, n. 1-2, p. 89-99, Apr 2012. ISSN 1559-0755. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392053 >.
MIOSSEC, P. Cytokines and the pathophysiology of bone erosions in rheumatoid arthritis. **J Clin Rheumatol,** v. 3, n. 2 Suppl, p. 81-3, Apr 1997. ISSN 1076-1608. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19078160 >.
_____. IL-17 in rheumatoid arthritis: a new target for treatment or just another cytokine? **Joint Bone Spine,** v. 71, n. 2, p. 87-90, Mar 2004. ISSN 1297-319X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050191 >.
_____. Update on interleukin-17: a role in the pathogenesis of inflammatory arthritis and implication for clinical practice. **RMD Open,** v. 3, n. 1, p. e000284, 2017. ISSN 2056-5933. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243466 >.
MIRMIRAN, P. et al. Dietary sodium to potassium ratio and the incidence of hypertension and cardiovascular disease: A population-based longitudinal study. **Clin Exp Hypertens**, p. 1-8, Jan 2018. ISSN 1525-6006. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29381403 >.
MIZUNO, K. et al. Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on cardiac hypertrophy and the tissue angiotensin II content in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci,** v. 51, n. 5, p. 367-74, 1992. ISSN 0024-3205. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385640 >.
MOJIRI-FORUSHANI, H. et al. Valsartan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibition of NF-κB expression and regulation of Th1/Th2 cytokines. **Immunopharmacol Immunotoxicol,** v. 40, n. 3, p. 225-231, Jun 2018. ISSN 1532-2513. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29447007 >.
MOON, Y. M. et al. IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther,** v. 14, n. 6, p. R246, Nov 2012. ISSN 1478-6362. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23148681 >.
MOREL, J. C. et al. Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NFkappaB activation. **Lab Invest,** v. 81, n. 10, p. 1371-83, Oct 2001. ISSN 0023-6837. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598150 >.
MOROVIĆ-VERGLES, J. [Pathophysiology of rheumatoid arthritis]. **Reumatizam,** v. 50, n. 2, p. 15-7, 2003. ISSN 0374-1338. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15098367 >.
MUROTA, A. et al. Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis. **Cytokine,** v. 78, p. 87-93, Feb 2016. ISSN 1096-0023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700586 >.
MURTAUGH, M. A. et al. Relationship of Sodium Intake and Blood Pressure Varies With Energy Intake: Secondary Analysis of the DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension)-Sodium Trial. **Hypertension,** v. 71, n. 5, p. 858-865, May 2018. ISSN 1524-4563. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29555665 >.
MÜLLER-LADNER, U.; GAY, R. E.; GAY, S. Role of nuclear factor kappaB in synovial inflammation. **Curr Rheumatol Rep,** v. 4, n. 3, p. 201-7, Jun 2002. ISSN 1523-3774. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010604 >.
NAKAYAMADA, S. et al. Differential effects of biological DMARDs on peripheral immune cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford),** v. 57, n. 1, p. 164-174, Jan 2018. ISSN 1462-0332. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28371836 >.
NALBANT, A.; ESKIER, D. Genes associated with T helper 17 cell differentiation and function. **Front Biosci (Elite Ed),** v. 8, p. 427-35, Jun 2016. ISSN 1945-0508. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27100349 >.

NANKI, T. et al. Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. **J Immunol,** v. 167, n. 9, p. 5381-5, Nov 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673556 >.
NISHIMOTO, N. [IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis]. **Nihon Naika Gakkai Zasshi,** v. 97, n. 10, p. 2413-7, Oct 2008. ISSN 0021-5384. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149037 >.
NOBRE, M.; GOMES, R. Rheumatoid Arthritis and Ischemic Heart Disease In Patients From Blumenau - Brazil. **Value Health,** v. 18, n. 7, p. A634, Nov 2015. ISSN 1524-4733. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26533555 >.
NORLANDER, A. E. et al. Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. **Hypertension,** v. 68, n. 1, p. 167-74, 07 2016. ISSN 1524-4563. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141060 >.
NTUSI, N. A. B. et al. Cardiovascular magnetic resonance characterization of myocardial and vascular function in rheumatoid arthritis patients. **Hellenic J Cardiol**, Jan 2018. ISSN 2241-5955. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29369795 >.
NZEUSSEU TOUKAP, A. et al. Myeloperoxidase and its products in synovial fluid of patients with treated or untreated rheumatoid arthritis. **Free Radic Res,** v. 48, n. 4, p. 461-5, Apr 2014. ISSN 1029-2470. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460011 >.
ORBACH, H. et al. Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1109, p. 385-400, Aug 2007. ISSN 0077-8923. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785327 >.
OSTOR, A. J.; MCCOLL, G. J. What's new in rheumatoid arthritis? An evidenced based review. **Aust Fam Physician,** v. 30, n. 4, p. 314-20, Apr 2001. ISSN 0300-8495. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11355216 >.
OTHMAN, M. A. et al. Correlation of Demographic and Clinical Characteristics with Rheumatoid Factor Seropositivity in Rheumatoid Arthritis Patients. **Malays J Med Sci,** v. 23, n. 6, p. 52-59, Nov 2016. ISSN 1394-195X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28090179 >.
PALA, O. et al. B Lymphocytes in Rheumatoid Arthritis and the Effects of Anti-TNF-α Agents on B Lymphocytes: A Review of the Literature. **Clin Ther,** v. 40, n. 6, p. 1034-1045, Jun 2018. ISSN 1879-114X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29801753 >.
PANOULAS, V. F. et al. Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford),** v. 46, n. 9, p. 1477-82, Sep 2007. ISSN 1462-0324. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17704521 >.
PARADOWSKA-GORYCKA, A. et al. Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RA). **Scand J Immunol,** v. 72, n. 2, p. 134-41, Aug 2010. ISSN 1365-3083. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618772 >.
PASCART, T. et al. Abatacept Monotherapy Versus Abatacept Plus Methotrexate for Treatment-Refractory Rheumatoid Arthritis. **Am J Ther**, Sep 2017. ISSN 1536-3686. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29023282 >.
PATEL, D. D.; KUCHROO, V. K. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. **Immunity,** v. 43, n. 6, p. 1040-51, Dec 2015. ISSN 1097-4180. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26682981 >.
PATTACINI, L. et al. Angiotensin II protects fibroblast-like synoviocytes from apoptosis via the AT1-NF-kappaB pathway. **Rheumatology (Oxford),** v. 46, n. 8, p. 1252-7, Aug 2007. ISSN 1462-0324. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17526929 >.
PEREIRA, I. A. et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus on the management of comorbidities in patients with rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol,** v. 52, n. 4, p. 474-95, Aug 2012. ISSN 1809-4570. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885417 >.
PEREIRA, M. C. et al. Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis. **Inflamm Res**, Jan 2014. ISSN 1420-908X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24419251 >.
PERSAD, R. et al. Angiogenic remodeling in pediatric EoE is associated with increased levels of VEGF-A, angiogenin, IL-8, and activation of the TNF-α-NFκB pathway. **J Pediatr Gastroenterol Nutr,** v. 55, n. 3, p. 251-60, Sep 2012. ISSN 1536-4801. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331014 >.

PETROVIC-RACKOV, L.; PEJNOVIC, N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol,** v. 25, n. 4, p. 448-52, Jul 2006. ISSN 0770-3198. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16362448 >.
PFEIFER, E. C. et al. The influence of early menopause on cardiovascular risk in women with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol,** v. 41, n. 7, p. 1270-5, Jul 2014. ISSN 0315-162X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882842 >.
PICERNO, V. et al. One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol,** v. 33, n. 4, p. 551-8, 2015 Jul-Aug 2015. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26203933 >.
PICKENS, S. R. et al. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. **J Immunol,** v. 184, n. 6, p. 3233-41, Mar 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173024 >.
POPESCU, C. et al. Dual X-Ray Absorptiometry Whole Body Composition of Bone Tissue in Rheumatoid Arthritis - a Cross-Sectional Study. **Maedica (Buchar),** v. 10, n. 1, p. 19-26, Mar 2015. ISSN 1841-9038. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26225145 >.
POPKOVA, T. V. et al. [Cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis]. **Ter Arkh,** v. 79, n. 5, p. 9-14, 2007. ISSN 0040-3660. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17672067 >.
PRENDERGAST, C. T. et al. Visualising the interaction of CD4 T cells and DCs in the evolution of inflammatory arthritis. **Ann Rheum Dis**, Jan 2018. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29358281 >.
PROTOGEROU, A. D. et al. Arterial hypertension assessed "out-of-office" in a contemporary cohort of rheumatoid arthritis patients free of cardiovascular disease is characterized by high prevalence, low awareness, poor control and increased vascular damage-associated "white coat" phenomenon. **Arthritis Res Ther,** v. 15, n. 5, p. R142, Oct 2013. ISSN 1478-6362. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286134 >.
PUKŠIĆ, S.; MOROVIĆ-VERGLES, J. [Comorbidities in patients with rheumatoid arthritis]. **Reumatizam,** v. 61, n. 2, p. 31-6, 2014. ISSN 0374-1338. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25427392 >.
QI, Y. F. et al. Elucidating the crosstalk mechanism between IFN-gamma and IL-6 via mathematical modelling. **BMC Bioinformatics,** v. 14, p. 41, Feb 2013. ISSN 1471-2105. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384097 >.
RAMIREZ-CARROZZI, V. et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. **Nat Immunol,** v. 12, n. 12, p. 1159-66, Oct 2011. ISSN 1529-2916. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993848 >.
RAMIRO, S. et al. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis,** v. 73, n. 3, p. 529-35, Mar 2014. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24401994 >.
_____. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis,** v. 76, n. 6, p. 1101-1136, Jun 2017. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298374 >.
REMUZGO-MARTÍNEZ, S. et al. Expression of osteoprotegerin and its ligands, RANKL and TRAIL, in rheumatoid arthritis. **Sci Rep,** v. 6, p. 29713, Jul 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403809 >.
RINALDI, N.; SCHWARZ-EYWILL, M. [Molecular mechanisms of cell-cell and cell-matrix interactions in the pathophysiology of rheumatoid arthritis]. **Z Rheumatol,** v. 58, n. 6, p. 333-44, Dec 1999. ISSN 0340-1855. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10663939 >.
RIVEROS, B. S.; ZIEGELMANN, P. K.; CORRER, C. J. Cost-Effectiveness of Biologic Agents in the Treatment of Moderate-to-Severe Psoriasis: A Brazilian Public Health Service Perspective. **Value Health Reg Issues,** v. 5, p. 65-72, Dec 2014. ISSN 2212-1102. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29702789 >.
RIVIÈRE, E. et al. Serum IL-33 level is associated with auto-antibodies but not with clinical response to biologic agents in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther,** v. 20, n. 1, p. 122, Jun 2018. ISSN 1478-6362. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29884223 >.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, L. et al. Treatment in rheumatoid arthritis and mortality risk in clinical practice: the role of biologic agents. **Clin Exp Rheumatol**, Oct 2016. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27749239 >.
ROELEVELD, D. M.; KOENDERS, M. I. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. **Cytokine,** v. 74, n. 1, p. 101-7, Jul 2015. ISSN 1096-0023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25466295 >.
ROOS, K. et al. Circulating secretory IgA antibodies against cyclic citrullinated peptides in early rheumatoid arthritis associate with inflammatory activity and smoking. **Arthritis Res Ther,** v. 18, n. 1, p. 119, May 2016. ISSN 1478-6362. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27215344 >.
RUIZ GARCIA, V. et al. Certolizumab pegol (CDP870) for rheumatoid arthritis in adults. **Cochrane Database Syst Rev,** v. 9, p. CD007649, 09 2017. ISSN 1469-493X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28884785 >.
RUIZ-ORTEGA, M. et al. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. **Circ Res,** v. 86, n. 12, p. 1266-72, Jun 2000. ISSN 1524-4571. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864918 >.
_____. Proinflammatory actions of angiotensins. **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 10, n. 3, p. 321-9, May 2001. ISSN 1062-4821. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342793 >.
_____. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. **Nephrol Dial Transplant,** v. 21, n. 1, p. 16-20, Jan 2006. ISSN 0931-0509. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280370 >.
SABIO, J. M. et al. Relationship between homocysteine levels and hypertension in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Care Res (Hoboken),** v. 66, n. 10, p. 1528-35, Oct 2014. ISSN 2151-4658. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692389 >.
_____. Cumulated organ damage is associated with arterial stiffness in women with systemic lupus erythematosus irrespective of renal function. **Clin Exp Rheumatol,** v. 34, n. 1, p. 53-7, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812222 >.
SAKUTA, T. et al. Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin receptor blockers. **Arthritis Rheum,** v. 62, n. 5, p. 1319-28, May 2010. ISSN 1529-0131. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213806 >.
SALEEM, M. D. et al. Interleukin-31 pathway and its role in atopic dermatitis: a systematic review. **J Dermatolog Treat,** v. 28, n. 7, p. 591-599, Nov 2017. ISSN 1471-1753. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28145790 >.
SANADA, S. et al. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. **J Clin Invest,** v. 117, n. 6, p. 1538-49, Jun 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492053 >.
SATTAR, N. et al. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. **Circulation,** v. 108, n. 24, p. 2957-63, Dec 2003. ISSN 1524-4539. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676136 >.
SCARSI, M. et al. Reduction of peripheral blood T cells producing IFN-γ and IL-17 after therapy with abatacept for rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol,** v. 32, n. 2, p. 204-10, 2014 Mar-Apr 2014. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24428959 >.
SCHIFF, M.; PEURA, D. HZT-501 (DUEXIS(®); ibuprofen 800 mg/famotidine 26.6 mg) gastrointestinal protection in the treatment of the signs and symptoms of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol,** v. 6, n. 1, p. 25-35, Feb 2012. ISSN 1747-4132. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149579 >.
SCHIFFRIN, E. L. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. **Clin Sci (Lond),** v. 126, n. 4, p. 267-74, Feb 2014. ISSN 1470-8736. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24144355 >.
SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity,** v. 23, n. 5, p. 479-90, Nov 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286016 >.

SCHOLZ, E. et al. A Comparative Analysis of the Peptide Repertoires of HLA-DR Molecules Differentially Associated With Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheumatol,** v. 68, n. 10, p. 2412-21, Oct 2016. ISSN 2326-5205. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158783 >.
SCOTT, D. L. Leflunomide improves quality of life in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol Suppl,** v. 112, p. 23-9, 1999. ISSN 0301-3847. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668524 >.
SCOTT, L. J. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. **Drugs,** v. 77, n. 17, p. 1865-1879, Nov 2017. ISSN 1179-1950. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29094311 >.
SCRIVO, R. et al. The role of dietary sodium intake on the modulation of T helper 17 cells and regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **PLoS One,** v. 12, n. 9, p. e0184449, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28877244 >.
SEEGERT, D. et al. Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. **Gut,** v. 48, n. 3, p. 326-32, Mar 2001. ISSN 0017-5749. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171821 >.
SELLAM, J. et al. Serum IL-33, a new marker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther,** v. 18, n. 1, p. 294, Dec 2016. ISSN 1478-6362. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27964756 >.
SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986. 46: 705-716. **J Immunol,** v. 177, n. 11, p. 7485-96, Dec 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114415 >.
SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **J Rheumatol,** v. 31, n. 3, p. 594-7, Mar 2004. ISSN 0315-162X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994410 >.
SEPEHRI, Z. et al. Atorvastatin, Losartan and Captopril Lead to Upregulation of TGF-β, and Downregulation of IL-6 in Coronary Artery Disease and Hypertension. **PLoS One,** v. 11, n. 12, p. e0168312, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28033321 >.
SHAHRARA, S. et al. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. **J Immunol,** v. 182, n. 6, p. 3884-91, Mar 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265168 >.
SHAO, J. et al. Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. **Hypertension,** v. 42, n. 1, p. 31-8, Jul 2003. ISSN 1524-4563. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771047 >.
SHENAVAR MASOOLEH, I. et al. Cardiac involvement in rheumatoid arthritis: A cross-sectional study in Iran. **Indian Heart J,** v. 68, n. 3, p. 332-5, 2016 May-Jun 2016. ISSN 0019-4832. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27316486 >.
SICA, D. A.; GEHR, T. W.; GHOSH, S. Clinical pharmacokinetics of losartan. **Clin Pharmacokinet,** v. 44, n. 8, p. 797-814, 2005. ISSN 0312-5963. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16029066 >.
SIEBERT, S. et al. Characteristics of rheumatoid arthritis and its association with major comorbid conditions: cross-sectional study of 502 649 UK Biobank participants. **RMD Open,** v. 2, n. 1, p. e000267, 2016. ISSN 2056-5933. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403335 >.
SILMAN, A. J. Epidemiology of rheumatoid arthritis. **APMIS,** v. 102, n. 10, p. 721-8, Oct 1994. ISSN 0903-4641. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7826600 >.
SILVEIRA, K. D. et al. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. **Peptides,** v. 46, p. 53-63, Aug 2013. ISSN 1873-5169. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727291 >.
SIMÕES E SILVA, A. C. et al. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. **Br J Pharmacol,** v. 169, n. 3, p. 477-92, Jun 2013. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23488800 >.
SINGH, H. et al. Evaluation of disease activity using DAS28- squeeze test in patients of rheumatoid arthritis. **J Assoc Physicians India,** v. 64, n. 1, p. 69, Jan 2016. ISSN 0004-5772. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27727913 >.

SMOLEN, J. S. et al. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. **Lancet,** v. 370, n. 9602, p. 1861-74, Dec 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570481 >.
SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet,** v. 388, n. 10055, p. 2023-2038, Oct 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156434 >.
SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Drug Discov,** v. 2, n. 6, p. 473-88, Jun 2003. ISSN 1474-1776. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12776222 >.
SNELLING, S. J. et al. Presence of IL-17 in synovial fluid identifies a potential inflammatory osteoarthritic phenotype. **PLoS One,** v. 12, n. 4, p. e0175109, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28399156 >.
SPURLOCK, C. F. et al. Methotrexate inhibits NF-κB activity via long intergenic (noncoding) RNA-p21 induction. **Arthritis Rheumatol,** v. 66, n. 11, p. 2947-57, Nov 2014. ISSN 2326-5205. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077978 >.
SRIRANGAN, S.; CHOY, E. H. The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Ther Adv Musculoskelet Dis,** v. 2, n. 5, p. 247-56, Oct 2010. ISSN 1759-7218. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870451 >.
STARNES, T. et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. **J Immunol,** v. 167, n. 8, p. 4137-40, Oct 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591732 >.
STOTT, B. et al. Human IL-31 is induced by IL-4 and promotes TH2-driven inflammation. **J Allergy Clin Immunol,** v. 132, n. 2, p. 446-54.e5, Aug 2013. ISSN 1097-6825. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23694808 >.
STRAND, V.; KEYSTONE, E.; BREEDVELD, F. Biologic agents for the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am,** v. 22, n. 1, p. 117-32, Feb 1996. ISSN 0889-857X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8907068 >.
SUKUMARAN, V. et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. **Life Sci,** v. 90, n. 7-8, p. 289-300, Feb 2012. ISSN 1879-0631. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210452 >.
_____. Cardioprotective effects of telmisartan against heart failure in rats induced by experimental autoimmune myocarditis through the modulation of angiotensin-converting enzyme-2/angiotensin 1-7/mas receptor axis. **Int J Biol Sci,** v. 7, n. 8, p. 1077-92, 2011. ISSN 1449-2288. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21927577 >.
SUNDSTRÖM, B.; JOHANSSON, I.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S. Diet and alcohol as risk factors for rheumatoid arthritis: a nested case-control study. **Rheumatol Int,** v. 35, n. 3, p. 533-9, Mar 2015. ISSN 1437-160X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428595 >.
SUZUKI, Y. et al. Inflammation and angiotensin II. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 35, n. 6, p. 881-900, Jun 2003. ISSN 1357-2725. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676174 >.
SVENSSON, B. et al. Persistently active disease is common in patients with rheumatoid arthritis, particularly in women: a long-term inception cohort study. **Scand J Rheumatol,** v. 45, n. 6, p. 448-455, Nov 2016. ISSN 1502-7732. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27095008 >.
SYMMONS, D. P.; GABRIEL, S. E. Epidemiology of CVD in rheumatic disease, with a focus on RA and SLE. **Nat Rev Rheumatol,** v. 7, n. 7, p. 399-408, May 2011. ISSN 1759-4804. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21629241 >.
TAKADA, H. et al. Increased IL-16 levels in hemophagocytic lymphohistiocytosis. **J Pediatr Hematol Oncol,** v. 26, n. 9, p. 567-73, Sep 2004. ISSN 1077-4114. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342983 >.
TANAKA, S. et al. RANKL: A therapeutic target for bone destruction in rheumatoid arthritis. **Mod Rheumatol,** v. 28, n. 1, p. 9-16, Jan 2018. ISSN 1439-7609. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28880683 >.

TE RIET, L. et al. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. **Circ Res,** v. 116, n. 6, p. 960-75, Mar 2015. ISSN 1524-4571. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25767283 >.
TEMPLIN, J. et al. Oscillating expression of interleukin-16 in multiple myeloma is associated with proliferation, clonogenic growth, and PI3K/NFKB/MAPK activation. **Oncotarget,** v. 8, n. 30, p. 49253-49263, Jul 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512269 >.
TERPOS, E. et al. Early effects of IL-6 receptor inhibition on bone homeostasis: a pilot study in women with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol,** v. 29, n. 6, p. 921-5, 2011 Nov-Dec 2011. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22032557 >.
TERRAS, S. et al. Increased serum IL-33 levels may indicate vascular involvement in systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis,** v. 72, n. 1, p. 144-5, Jan 2013. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22858587 >.
TORICES, S. et al. A functional variant of TLR10 modifies the activity of NFkB and may help predict a worse prognosis in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther,** v. 18, n. 1, p. 221, Oct 2016. ISSN 1478-6362. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27716427 >.
TORNERO-MOLINA, J. et al. Methotrexate in patients with rheumatoid arthritis in Spain: Subanalysis of the AR Excellence project. **Reumatol Clin**, Dec 2017. ISSN 1885-1398. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29273497 >.
TOTH, P. P. Losartan reduces cardiovascular morbidity and mortality in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. **Curr Atheroscler Rep,** v. 5, n. 5, p. 339-40, Sep 2003. ISSN 1523-3804. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12911842 >.
TOYOTA, Y. et al. Musculoskeletal ultrasonography delineates ankle symptoms in rheumatoid arthritis. **Mod Rheumatol**, p. 1-5, Sep 2016. ISSN 1439-7609. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27539651 >.
TUNDIA, N. et al. Economic impact of expanded use of biologic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease in Argentina, Brazil, Colombia, and Mexico. **J Med Econ,** v. 19, n. 12, p. 1187-1199, Dec 2016. ISSN 1941-837X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376404 >.
TURIEL, M. et al. The heart in rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev,** v. 9, n. 6, p. 414-8, Apr 2010. ISSN 1873-0183. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913641 >.
URSINI, F. et al. Old But Good: Modified-Release Prednisone in Rheumatoid Arthritis. **Rev Recent Clin Trials,** v. 12, n. 2, p. 124-128, 2017. ISSN 1876-1038. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356031 >.
VAN DER HEIJDE, D. et al. EULAR definition of erosive disease in light of the 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria. **Ann Rheum Dis,** v. 72, n. 4, p. 479-81, Apr 2013. ISSN 1468-2060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23378540 >.
VASTESAEGER, N. et al. Prediction of remission and low disease activity in disease-modifying anti-rheumatic drug-refractory patients with rheumatoid arthritis treated with golimumab. **Rheumatology (Oxford),** v. 55, n. 8, p. 1466-76, 08 2016. ISSN 1462-0332. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114562 >.
VOCCA, L. et al. IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. **Immunobiology,** v. 220, n. 8, p. 954-63, Aug 2015. ISSN 1878-3279. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747940 >.
VOLIN, M. V.; KOCH, A. E. Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis. **J Interferon Cytokine Res,** v. 31, n. 10, p. 745-51, Oct 2011. ISSN 1557-7465. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864160 >.
WALSH, D. A. et al. AT1 receptor characteristics of angiotensin analogue binding in human synovium. **Br J Pharmacol,** v. 112, n. 2, p. 435-42, Jun 1994. ISSN 0007-1188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8075862 >.
WANG, F. et al. Losartan inhibits LPS + ATP-induced IL-1beta secretion from mouse primary macrophages by suppressing NALP3 inflammasome. **Pharmazie,** v. 69, n. 9, p. 680-4, Sep 2014. ISSN 0031-7144. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272939 >.

WANG, J. et al. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis B. **J Interferon Cytokine Res,** v. 32, n. 6, p. 248-53, Jun 2012. ISSN 1557-7465. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22304300 >.

_____. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis C. **Mediators Inflamm,** v. 2012, p. 819636, 2012. ISSN 1466-1861. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315510 >.

WANG, S. L. et al. [Effects of enalapril on IL-1beta, IL-6 expression in rat lung exposure to acrolein]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban,** v. 41, n. 6, p. 1003-7, 1038, Nov 2010. ISSN 1672-173X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21265103 >.

WEBER, M. A. Clinical experience with the angiotensin II receptor antagonist losartan. A preliminary report. **Am J Hypertens,** v. 5, n. 12 Pt 2, p. 247S-251S, Dec 1992. ISSN 0895-7061. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1290620 >.

WEI, S. T. et al. Serum Levels of IL-6 and TNF-α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. **Med Sci Monit,** v. 21, p. 4030-8, Dec 2015. ISSN 1643-3750. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26704133 >.

WIENS, A. et al. Profile of users of anticytokines offered by the health care system in the state of Paraná for the treatment of rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol,** v. 52, n. 2, p. 208-13, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 1809-4570. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460410 >.

WOODRICK, R. S.; RUDERMAN, E. M. IL-6 inhibition for the treatment of rheumatoid arthritis and other conditions. **Bull NYU Hosp Jt Dis,** v. 70, n. 3, p. 195-9, 2012. ISSN 1936-9727. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23259628 >.

WU, B. et al. Valsartan attenuates oxidative stress and NF-κB activation and reduces myocardial apoptosis after ischemia and reperfusion. **Eur J Pharmacol,** v. 705, n. 1-3, p. 140-7, Apr 2013. ISSN 1879-0712. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499691 >.

WYLIE-SEARS, J.; LEVINE, R. A.; BISCHOFF, J. Losartan inhibits endothelial-to-mesenchymal transformation in mitral valve endothelial cells by blocking transforming growth factor-β-induced phosphorylation of ERK. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 446, n. 4, p. 870-5, Apr 2014. ISSN 1090-2104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24632204 >.

XIE, Q.; HUANG, C.; LI, J. Interleukin-22 and rheumatoid arthritis: emerging role in pathogenesis and therapy. **Autoimmunity,** v. 48, n. 2, p. 69-72, Mar 2015. ISSN 1607-842X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483133 >.

XIE, Q.; WANG, S. C.; LI, J. Interleukin 22, a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. **J Rheumatol,** v. 39, n. 11, p. 2220; author reply 2221, Nov 2012. ISSN 0315-162X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118293 >.

XU, L. L. et al. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. **J Leukoc Biol,** v. 60, n. 3, p. 365-71, Sep 1996. ISSN 0741-5400. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8830793 >.

XUE, H. et al. The IL-16 gene polymorphisms and the risk of the systemic lupus erythematosus. **Clin Chim Acta,** v. 403, n. 1-2, p. 223-5, May 2009. ISSN 1873-3492. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19298795 >.

YAMANAKA, K. et al. IL-13 regulates IL-17C expression by suppressing NF-κB-mediated transcriptional activation in airway epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 495, n. 1, p. 1534-1540, 01 2018. ISSN 1090-2104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29203240 >.

YANG, Z. et al. Association of increased serum IL-33 levels with clinical and laboratory characteristics of systemic lupus erythematosus in Chinese population. **Clin Exp Med,** v. 11, n. 2, p. 75-80, Jun 2011. ISSN 1591-9528. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20963466 >.

YING, B. et al. Association of polymorphisms in the human IL-10 and IL-18 genes with rheumatoid arthritis. **Mol Biol Rep,** v. 38, n. 1, p. 379-85, Jan 2011. ISSN 1573-4978. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424918 >.

YOSHIMOTO, T. et al. Role of IL-16 in delayed-type hypersensitivity reaction. **Blood,** v. 95, n. 9, p. 2869-74, May 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779433 >.

YU, J. I. et al. Polymorphisms of interleukin-31 are associated with anti-CCP levels in females with rheumatoid arthritis. **J Genet,** v. 93, n. 3, p. 813-7, Dec 2014. ISSN 0973-7731. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572240 >.
YUAN, J. et al. The signalling pathways of interleukin-6 and gamma interferon converge by the activation of different transcription factors which bind to common responsive DNA elements. **Mol Cell Biol,** v. 14, n. 3, p. 1657-68, Mar 1994. ISSN 0270-7306. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509445 >.
YUE, C. et al. The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients. **Rheumatol Int,** v. 30, n. 12, p. 1553-7, Nov 2010. ISSN 1437-160X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847432 >.
YUSUF, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet,** v. 364, n. 9438, p. 937-52, 2004 Sep 11-17 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364185 >.
ZHANG, L. et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. **J Clin Immunol,** v. 31, n. 4, p. 606-14, Aug 2011. ISSN 1573-2592. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556937 >.
ZHANG, W. et al. IL-18 upregulates the production of key regulators of osteoclastogenesis from fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. **Inflammation,** v. 36, n. 1, p. 103-9, Feb 2013. ISSN 1573-2576. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22945280 >.
ZHAO, L. et al. IL-22+ CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. **Int J Rheum Dis,** v. 16, n. 5, p. 518-26, Oct 2013. ISSN 1756-185X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24164838 >.
ZHENG, Y. et al. TNFα promotes Th17 cell differentiation through IL-6 and IL-1β produced by monocytes in rheumatoid arthritis. **J Immunol Res,** v. 2014, p. 385352, 2014. ISSN 2314-7156. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25436214 >.
ZHOU, R. P. et al. Functions of interleukin-34 and its emerging association with rheumatoid arthritis. **Immunology,** v. 149, n. 4, p. 362-373, Dec 2016. ISSN 1365-2567. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27550090 >.
ZHU, J. et al. Interleukin-22 Secreted by NKp44+ Natural Killer Cells Promotes Proliferation of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. **Medicine (Baltimore),** v. 94, n. 52, p. e2137, Dec 2015. ISSN 1536-5964. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26717357 >.
ZIOLKOWSKA, M. et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. **J Immunol,** v. 164, n. 5, p. 2832-8, Mar 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679127 >.
ZRIOUAL, S. et al. Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synoviocytes. **J Immunol,** v. 182, n. 5, p. 3112-20, Mar 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234208 >.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA – SUELY GALDINO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Avaliação in vitro da atividade imunomoduladora dos bloqueadores do receptor de angiotensina, que está sob a responsabilidade do pesquisador Pablo Ramon Gualberto Cardoso, com endereço Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, E-mail: prgc@outlook.com e Telefone (celular) +55 (81) 99849-1848. Também participam desta pesquisa os pesquisadores:

Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte	Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta
E-mail: Angelabduarte@hotmail.com	E-mail: irpitta@gmail.com
Profa. Dra. Claudia Diniz Lopes Marques	Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira
E-mail: claudia_reumatologia@terra.com.br	E-mail: michelly2305@yahoo.com.br
Profa. Dra. Andrea Tavares Dantas	Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Email: andreatdantas@gmail.com	E-mail: moacyroraculo@gmail.com
Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta	Me. Laurindo Ferreira da Rocha Junior
E-mail: mgrpitta@gmail.com	E-mail: laurindorochajr@hotmail.com

Disponíveis no telefone: (81) 2126-8346

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa que visa estudar o que acontece no corpo fazendo com que a artrite reumatóide se desenvolva. Além disso, visa também aprimorar o conhecimento sobre aspectos clínicos da Artrite Reumatóide e sua relação com aspectos farmacológicos e aplicabilidade na prática clínica. Nosso objetivo é descobrir o que está desregulado no seu corpo, levando ao desenvolvimento desta doença e buscar melhores associações de tratamentos. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue que é coletado da sua veia como uma coleta de sangue para exames laboratoriais. Deste modo, nenhum medicamento será administrado em você por ninguém em momento algum.

Caso concorde, você participará desta pesquisa apenas uma vez com a coleta de sangue. O sangue coletado será avaliado pelos pesquisadores, e nada mais será necessário.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (15 ml).

RISCOS: A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar um pequeno hematoma, que é uma área arroxeada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta

será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Caso ocorra a formação do hematoma, será aplicada compressa gelada para reduzir a vermelhidão.

BENEFÍCIOS: Os benefícios da pesquisa não se restringem ao indivíduo, estendendo-se a sociedade como um todo, uma vez que os resultados obtidos poderão propiciar um maior conhecimento sobre a etiopatogênese e tratamento da Artrite Reumatóide. Sendo assim, permitirá não só um melhor entendimento da doença como a possibilidade da identificação de novos alvos terapêuticos, para uma doença comum na população mundial.
A coleta de dados só será iniciada após a aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP e o cronograma será devidamente cumprido.
Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (sangue), ficarão armazenados em ultra freezer -80°C, sob a responsabilidade do pesquisador responsável **Pablo Ramon Gualberto Cardoso**, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).
Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

_____
(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Avaliação in vitro da atividade imunomoduladora dos bloqueadores do receptor de angiotensina, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____
Assinatura do participante: _____

Impressão digital em caso de não alfabetizado.

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Nome:
Assinatura:

Nome:
Assinatura:

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA THE OPEN RHEUMATOLOGY JOURNAL

---------- Forwarded message ---------
From: The Open Rheumatology Journal <torj@benthamopen.org>
Date: qua, 18 de jul de 2018 06:09
Subject: **Manuscript Acceptance letter** | BMS-TORJ-2018-10
To: <moacyr.rego@gmail.com>
Cc: <torj@benthamopen.org>, <ifrahazhar@benthamopen.com>

Reference#: BMS-TORJ-2018-10

Submission Title: Losartan, but not Enalapril and Valsartan, inhibits the expression of IFN-γ, IL-6, IL-17F and IL-22 in PBMCs from Rheumatoid Arthritis patients

Dear Dr., Moacyr Rêgo,

I am pleased to inform you that your article entitled "Losartan, but not Enalapril and Valsartan, inhibits the expression of IFN-γ, IL-6, IL-17F and IL-22 in PBMCs from Rheumatoid Arthritis patients" **has been accepted for publication in "The Open Rheumatology Journal" after independent peer review**.

You will be pleased to know that Bentham Open has collaborated with Kudos to increase the portfolio of its services for Bentham authors. Kudos is among the preferred media for researchers. It is a web-based service that helps researchers maximize the visibility, usage of and citations to published articles (www.growkudos.com.) Kudos will be contacting you to register to use this service.

We have reached a decision regarding your submission to "The Open Rheumatology Journal". The manuscript has been reviewed by the editorial board members of the journal and independent experts in the field. Based on the reviewer's comments, I am delighted to inform you that the manuscript is now accepted for publication in the journal. On behalf of the Editorial Board, I would like to thank for your contribution and hope that you will consider this journal for future manuscripts.

We wish to thank you for submission of the manuscript to "The Open Rheumatology Journal" and look forward to a continued collaboration in the
future.

Again, I sincerely thank you for submission of the manuscript in The Open Rheumatology Journal.

Our decision is to: **Accept Submission**

With warm regards,
Ambreen Irshad
Senior Editor
Bentham Open
ambreenirshad@benthamopen.com

Losartan, but not Enalapril and Valsartan, inhibits the expression of IFN-γ, IL-6, IL-17F and IL-22 in PBMCs from Rheumatoid Arthritis patients

Losartan inhibits the expression of IFN-γ, IL-6, IL-17F and IL-22 in Rheumatoid Arthritis

Pablo Ramon Gualberto Cardoso[1], Katherine Aquino Matias[1], Andrea Tavares Dantas[2], Claudia Diniz Lopes Marques[2], Michelly Cristiny Pereira[1], Angela Luzia Branco Pinto Duarte[2], Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego[1], Ivan da Rocha Pitta[1], Maira Galdino da Rocha Pitta[1]*

1. Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas Suely Galdino (Nupit SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.
2. Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

*Correspondence address to Prof. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (Nupit SG), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, 50670-901, Brazil. E-mail: mgrpitta@gmail.com

Abstract

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and inflammatory disease that affects about 1% of the world's population. Almost 70% of RA patients have a cardiovascular disease such as systemic arterial hypertension (SAH). Inflammatory cytokines are clearly involved in the pathogenesis of RA and correlated with SAH.

Objective: It is necessary to understand whether the antihypertensive drugs have a dual effect as immunomodulators and which one is the best choice for RA SAH patients.

Methods: Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from 16 RA patients were purified and stimulated or not stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAB and were treated with Enalapril, Losartan and Valsartan at 100μM. Patients were evaluated for clinical and laboratory variables including measures of disease activity by Clinical Disease Activity Index (CDAI) and Disease Activity Score (DAS28). Cytokines were quantified by ELISA sandwich.

Results: Losartan was able to reduce levels of IFN-γ ($p = 0.0181$), IL-6 ($p = 0.0056$), IL-17F (0.0046) and IL-22 ($p = 0.0234$) in RA patients. In addition, patients in remission and mild score (DAS28<3.2 and CDAI<10) had a better response to treatment. On the other hand, patients in moderate and severe activity had poor response to Losartan in cytokine inhibition.

Conclusion: PBMCs from RA patients are responsive in inhibiting proinflammatory cytokines using Losartan better than Enalapril and Valsartan and it could be a better antihypertensive choice for patients with RA and systemic arterial hypertension treatment.

Key-words: Cytokines, Immunomodulatory effects, Therapy, Systemic Arterial Hypertension, Cardiovascular Disease, Rheumatology

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and systemic disease that affects the joints, connective tissues, muscles, tendons and fibrous tissues, and in addition to pain, causing deformations in the bony-cartilaginous structure. The prevalence is approximately 1% of the world population (1). The RA is mediated by Th1/Th17 cells, where TNF, IL-6 and IL-17 cytokines are key components in the RA pathogenesis (2).

Cardiovascular disease (CVD) represents one of the most frequent comorbidities in RA patients, and it is responsible for increasing the mortality of this population up to twice (3, 4). A recent study indicates that in several countries, cardiovascular diseases remain the main comorbidities found in patients with RA (4). The prevalence of systemic arterial hypertension (SAH) is high in patients with RA, ranging from 53% -73% (5). When comparing this percentage with the general population, this index is no more than 23% (5). It is also known that hypertension is associated with the presence of asymptomatic lesions in RA patients regardless of the level of inflammatory activity (6). With this, the need has become evident for a better understanding and attention at the moment of medication prescription for patients with RA (7).

Recent studies have highlighted the role of inflammation in the development of hypertension. Mechanisms of innate immunity, effector and regulatory T cells, and costimulatory molecules seem to be involved in the ethiopatogenesis of hypertension, interacting mostly with the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). This is the main responsible agent for the regulation of blood pressure and water balance (8). It is suggested that the RAAS has a relationship with the activation of the immune system once there is more circulating aldosterone, activating angiotensin type 1 (AT1) receptors in immune cells such as lymphocytes and monocytes (9, 10).

There is a consensus of the Brazilian Society of Rheumatology regarding the treatment of comorbidities in RA. For SAH, the indicated treatment is composed of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and/or angiotensin II receptor blockers (ARBs), preferably (11).

In a study with rats on an experimental autoimmune myocarditis and treated with Valsartan, there was a suppression of Th1 serum cytokine levels and significant positive regulation of Th2 cytokines, demonstrating the benefits of Valsartan as a balance modulator of Th subgroups (12). Some studies point to Enalapril as a weak immunomodulator with few effects on the cytokine production by macrophages (13, 14). On the other hand, Losartan presented better results being able to reduce IL-6 levels and increasing TGF-β production in patients with cardiovascular diseases (15, 16).

Valsartan and Telmisartan were tested in type II diabetes with immune effects, perhaps binding to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR-γ) (17), and Valsartan is able to slow down the progression of chronic kidney disease (18). In adult patients with Marfan syndrome, Losartan as treatment reduced the rate of dilation of the aortic arch (19). In addition, Losartan and Enalapril were capable of reducing the expression of IL-1β in macrophages (20) and polymorphonuclear leukocytes from patients with essential hypertension (21).

Clearly ARBs and ACEs have different effects besides blood pressure control, but their immunomodulatory effects in PBMCs from RA patients are still unclear. The objective of the present study was to evaluate the effects of Enalapril, Losartan and Valsartan on the production of IL-2, IL-10, IL-6, TNF, IFN-γ, IL-17A, IL-17F and IL-22 cytokines in PBMCs of patients with rheumatoid arthritis and evaluate this modulation with disease activity.

Methods

Volunteers Recruitment

Sixteen RA patients were invited and recruited from Rheumatology Division at Clinics Hospital – Federal University of Pernambuco, Brazil, to participate. Demographic and clinical parameters were collected from all patients by questionnaire (Table 1). DAS28 and CDAI were measured and criteria for RA classification (22, 23). A DAS28 lower than 3.2 implied low disease activity, between 3.2–5.1 implied moderate and higher than 5.1 meant high disease activity, while CDAI less than 2.8 implied clinical remission, lower than 10 implied mild activity, between 10–22 implied moderate and finally higher than 22 score implied severe activity. The presence of other rheumatic diseases, cardiovascular, endocrine and thyroid, immunomodulated and cancer diseases were exclusion criteria for all volunteers. Moreover, being under biological, immunomodulatory or antihypertensive treatments also were exclusion criteria. The study was approved by the Federal University of Pernambuco (UFPE) ethics committee (CAAE: 53555116.0.0000.5208).

Antihypertensives Drugs

We used 3 antihypertensive drugs. Two of them are ARBs, Losartan and Valsartan and an ACE Enalapril. All medicines were chosen because they are widely used in cardiovascular diseases around the world. For a better understanding, the drugs were named using the initials: Enalapril (E), Losartan (L) and Valsartan (V).

PBMCs Sample for Immunomodulatory Experiments

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from RA volunteers were obtained using a heparinized tube and isolated by density-gradient centrifugation with Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Therefore, 1× 〖10〗 ^6 cells/ml were disposed in RPMI-1640 media (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), HEPES 10 mM (Gibco) and penicillin/streptomycin 200 U/ml (Gibco).

Cells were stimulated using anti-CD3 and anti-CD28 Monoclonal Antibodies (mAB) (eBioscience) - once RA is a T-lymphocyte-mediated disease - (24, 25) in the presence or absence of Losartan, Valsartan and Enalapril at 100μM. Methylprednisolone at 100μM was used as a standard drug. Cells were incubated for 48hours at 37°C in humidified 5% CO2 incubator, therefore the supernatant was collected and stocked at -80°C for posterior dosages.

Cytokine Measurement

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions determined Cytokines present in the supernatants. The detection limits for TNF, IL-10, IL-6 and IFN-γ (BD Biosciences), IL-2, IL-17A, IL-17F and IL-22 (eBioscience) were 3.90, 3.90, 4.68, 4.68, 1.95, 3.90, 15.62 and 7.81 pg/ml, respectively.

Statistical analysis

The Wilcoxon and Student's t tests were used for statistical analysis and p values < 0.05 were statistically significant. Values are expressed as the median, maximum and minimum for supernatant dosages and mean ± standard deviation (SD) for demographic parameters. All quantitative data was plotted with GraphPad Prism® 6.01.

Results

RA Patients Parameters

A total of 16 patients fulfilled four or more American College of Rheumatology (ACR) 2010 diagnostic criteria (26). Individual disease activity was quantified using the DAS28 (23) and

CDAI (22). Demographic, clinical and laboratory data were collected, and these results are shown in **Table 1**.

Characteristics Patients (n = 16)	Data
Female n	14
Male n	2
Age (years), mean (min-max)	53 (32 – 73)
Disease Duration (years), mean (range)	10 (±7,9)
DAS28 (%)	
Low Disease Activity (≤3.2)	9 (56%)
Moderate and High Disease Activity (>3.2)	7 (44%)
CDAI (%)	
Low Disease Activity (≤ 10)	8 (50%)
Moderate and High Disease Activity (> 10)	8 (50%)
Treatment (%)*	
None	3
Prednisone	9
Methotrexate	11
Leflunomide	2
ESR mean (range mm/h)	16 (±10)
Rheumatoid Factor (%)	16 (100%)

***** Eight patients were on Prednisone and Methotrexate combination and only one on Leflunomide and Methotrexate combination.

Enalapril, Losartan and Valsartan Inhibiting Inflammatory Cytokines

The first step was to evaluate the cytotoxicity of the antihypertensives Enalapril (E), Losartan (L) and Valsartan (V) in PBMC to confirm a non-toxic concentration. We tested five different concentrations (10, 25, 50, 75 and 100μM) in triplicate of concentration and triplicate of experiment. None of the drugs tested showed toxicity at the used concentration and viability was higher than 98% (data not shown) and the 100μM was used for tests.

Cytokines levels can be seen in **Figure 1**. Median, maximum and minimum expresses the results. There was a significant decrease in IFN-γ by Enalapril at 100μM [2988.53 (18895.29-4.68)] (p= 0.0302) compared to the stimulated condition [5157.895 (63637.65-155.29)] and IL-22 [13.65 (195.58-7.81)] compared to mAB stimulation only [100.84 (218.67-9.50)] (p=0.0161).

Losartan had immunomodulatory effects reducing IFN-γ, IL-6, IL-17F and IL-22. For IFN-γ, there was significant decrease by Losartan at 100μM [2252.6 (20461.1-4.6)] compared to the stimulated condition (p = 0.0181). For IL-6 it was [2154.2 (8480.8-4.6)] compared to the stimulated condition [3178.60 (10064.8-136.4)] (p = 0.0056). We also found a significant reduction in IL-17F by Losartan [457.6 (1239.8-129.6)] compared to the stimulated condition [1181.5 (3836.5-236.0)] (p = 0.0046). Finally, IL-22 had a significant reduction by Losartan in

RA group [100.4 (175.5-7.8)] compared to the stimulated condition [100.84 (218.67-9.50)] (p = 0.0234). Valsartan showed no significant association.

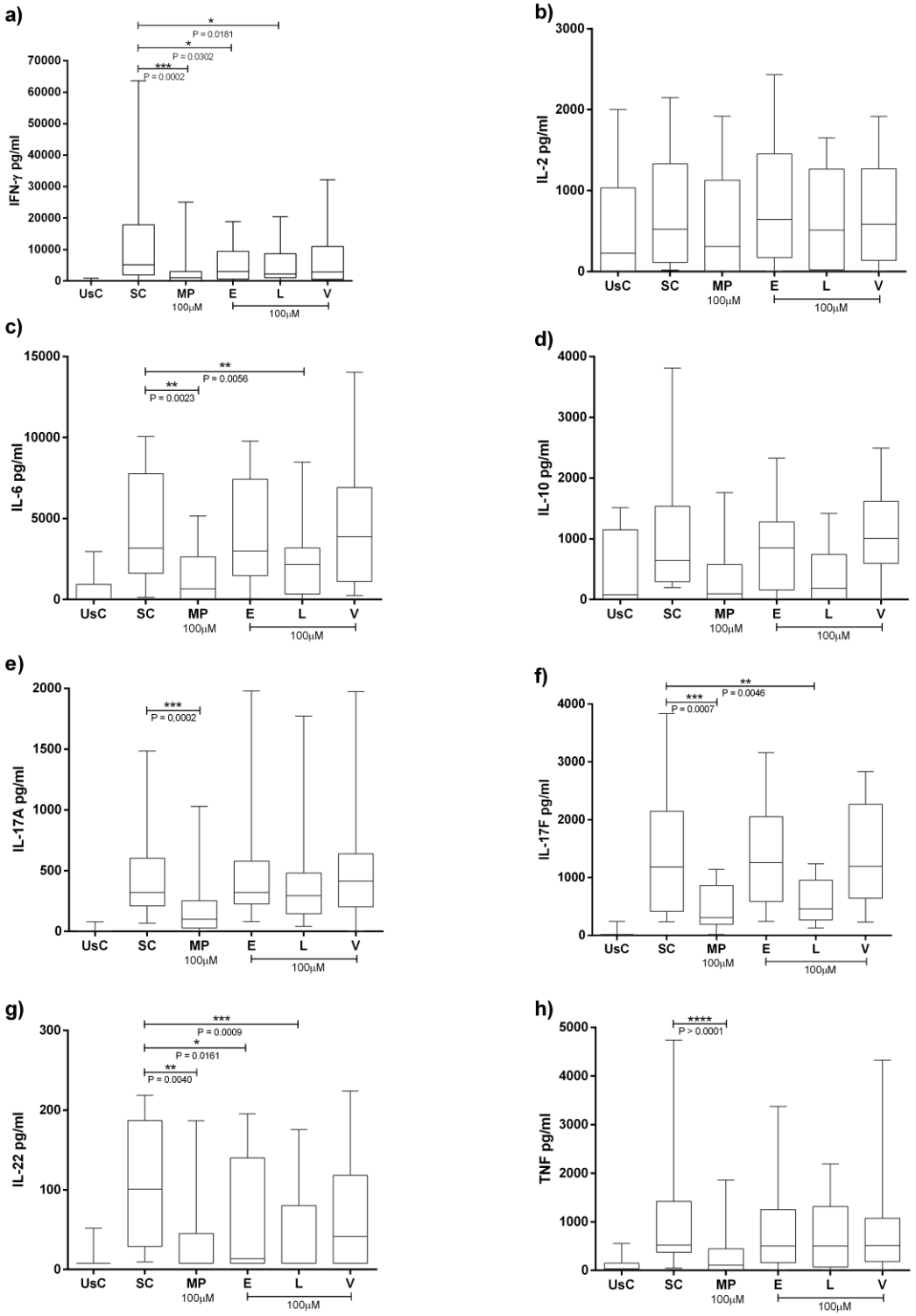


Figure 1: In vitro effects of Enalapril, Losartan and Valsartan after stimulation on PBMCs and their cytokines in RA. PBMCs from RA patients following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAB (SC) were treated with different conditions, Enalapril (E), Losartan (L) and Valsartan (V) at 100µM and Methylprednisolone (MP) at 100µM as standard drug. Cytokine concentrations of Th1/Th2/Th17 type cytokines were measured by ELISA in supernatants of

PBMCs cultures from RA patients. A significant reduction in the IFN-γ and IL-22 concentration was detected in cultures of RA patients with Enalapril. Losartan reduced the concentration of IFN-γ; IL-6; IL-17F and IL-22 in PBMCs from RA patients. IL-2, IL-10 and IL-17A culture supernatants revealed no significant changes. Valsartan did not reduce any concentration in cytokines. (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ and **** = $p < 0.0001$)

Effect of Antihypertensive Drugs on Cytokine Profile Association with Disease Activity of RA

Subsequently, we analyzed the effect of Enalapril, Losartan and Valsartan on the cytokine profile and evaluated if there was any correlation with disease activity measured by DAS28 and CDAI. There was significant association for IFN-γ, IL-10, IL-17F and IL-22 according DAS28 < 3.2 ($p = 0.0391$; 0.0313; 0.0156; 0.0156 respectively) and for DAS28 > 3.2 in IL-22 reduction ($p = 0,0313$) after 100μM of Losartan treatment (**Fig. 2A**). In concurrence, there was significant association for IFN-γ, IL-6 and IL-22 also according CDAI < 10 ($p = 0.0391$; 0.0391; 0.0313 respectively) after 100μM of Losartan treatment (**Fig. 2B**). No association was found in Enalapril and Valsartan treatments.

It was observed that RA patients with severe disease had a worse response to the Losartan in reducing cytokines levels. The same profile was observed for other cytokines, however without significance.

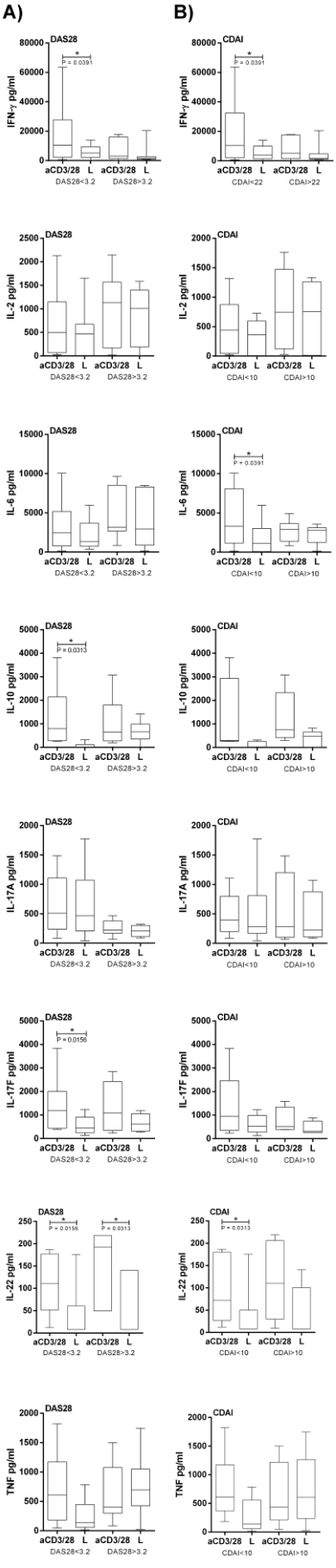

A)
B)
DAS28
CDAI
IFN-γ pg/ml
IL-2 pg/ml
IL-6 pg/ml
IL-10 pg/ml
IL-17A pg/ml
IL-17F pg/ml
IL-22 pg/ml
TNF pg/ml
P = 0.0391
P = 0.0313
P = 0.0156
aCD3/28
L
DAS28<3.2
DAS28>3.2
CDAI<22
CDAI>22
CDAI<10
CDAI>10

Figure 2. Cytokine levels from patients with rheumatoid arthritis treated with 100μM of Losartan and a Disease Activity Score for 28 joints (a IFN-γ; IL-2; IL-6; IL-17A; IL-17F; IL-22; TNF) and a Clinical Disease Activity Index (b IFN-γ; IL-2; IL-6; IL-17A; IL-17F; IL-22; TNF).

Discussion

Experimental in vitro and in vivo studies have strongly demonstrated that antihypertensive drugs have anti-inflammatory and immunomodulatory functions (8, 12, 15, 27). However, the potential of these drugs in rheumatoid arthritis disease has not yet been demonstrated. We decided to analyze the effect of anti-hypertensive drugs in PBMCs variations corresponding to disease activity by DAS28 and CDAI according to the international criteria.

RA develops and progresses with the immune system imbalance involving defense cells, mainly by B cells and CD4+ T cells and their subgroups. The most involved T helper in RA pathogenesis are Th1 and Th17 and their inflammatory cytokines produced (28). RA patients generally suffer with cardiovascular diseases - incidence is higher than 70% (5). Immunological markers of inflammation are expressed in higher concentrations in RA patients who have CVC diseases, including highly sensitive C-reactive protein (29).

For SAH in RA, the indicated treatment is composed of ACE and/or ARBs, preferably (11). ACE inhibitors and ARBs are used in the treatment of cardiovascular diseases with good results, including for RA patients (30). Cardiovascular risk factors and systemic inflammation are associated with the rapid progression of carotid intima-media thickness in RA patients (31). For this reason, it is necessary to test whether the antihypertensive drugs promote immunomodulation and if one of them can be a first decision for the SAH treatment in RA patients.

Our results show that Losartan at 100μM could significantly reduce IFN-γ, IL-6, IL-17F, IL-22 cytokine levels secreted by PBMCs in RA cultures. The other antihypertensive drugs tested, Enalapril and Valsartan had few or no immunomodulatory effects on the production of proinflammatory cytokines in PBMCs.

We showed that Losartan consistently reduced IL-17F cytokine levels in a 100μM concentration. In addition, IL-17F correlates with disease severity by DAS28 and CDAI, Losartan was able to sensitize patients' cells in remission/mild/moderate RA condition reducing the levels of this cytokine, but no effects were seen in severe score.

Proinflammatory cytokines are involved in RA and aggravate the disease development. One of them is IL-17. IL-17A and IL-17F are highly reported in RA and contribute to the RA pathogenesis (32). Both IL-17A and IL-17F are present in synovium and aggravate the illness (28). Accordingly, IL-17F appears as a target in Th17-mediated diseases such as RA. (33, 34). That is interesting because although involved in RA, IL-17 also plays a key role in the pathogenesis of arterial hypertension, inducing the production of angiogenic factors and migration of endothelial cells (35). IL-17A also mediates Angiotensin II (Ang II) induced renal injury and regulates renal sodium transporters, activating a serum and glucocorticoid regulated kinase 1 dependent pathway, and it could cause a sodium and water imbalance and therefore elevating the blood pressure (35-37). Reducing IL-17 circulating levels would not only have an improvement in RA but would also benefit hypertensive patients.

As we demonstrated, our results show a potential immunoregulation of Losartan in reducing IFN-γ levels. In addition to this Losartan was also able to statistically reduce significant IL-6 levels in PBMC culture from RA patients.

IFN-γ and IL-6 are two inflammatory cytokines with innumerable functions, such as cell proliferation and immune system regulation. IL-6 also is a treatment target for RA (38). Cell

responses from both are activated via Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins (JAK/STAT) pathway (39). The IFN family is related to the pathogenesis of RA and this is well described (40, 41). This cytokine undoubtedly participates in the joint inflammation promoting cell recruitment and proliferation. IFN-γ is also considered a marker for RA (42). IFN-γ and IL-6, although distinct, act together and can be produced in parallel in an inflammation site via similar transcription factors such as interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (43). In addition, IL-6 is also crucial in the pathogenesis of RA (44). It is correlated with swollen joint count, c-reactive protein levels and associated with DAS28 severity, rheumatoid factor and serology of anti-citrullinated peptide antibodies (45).

Our results suggest that Losartan could significantly reduce the IL-22 levels produced by PBMC from RA patients. IL-22 is a pleiotropic cytokine. It is related to osteoclastogenesis by positively regulating the expression of Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) mediated via Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) and Factor Nuclear kappa B - p38 MAPK/NF-κB and JAK-2/STAT-3 - signaling pathways (46). But at the same time CD4 + Th22 cells are also related to the pathogenesis of RA, contributing to the worsening of this disease (47) by promoting the proliferation of synoviocytes (48), and may become a therapeutic target soon (49-51). Few studies have correlated the levels of IL-22 with the RA severity and possible treatments to reduce this cytokine production (40, 52, 53).

For all cytokines evaluated we observed that patients with severe activity of disease (DAS28 > 3.2 and CDAI > 10) respond in worse efficiency to Losartan treatment. Patients in severe conditions probably have their cells sensitized due to an anti-inflammatory treatment and this makes the in vitro study harder. As RA is a chronic and degenerative disease, nowadays it is very difficult to recruit patients in severe conditions who are not taking any anti-inflammatory medication. A previously analysis was not performed to affirm if patients who were on Prednisone treatment could be an influencing factor.

Of the three antihypertensive drugs tested, Losartan improved immunomodulatory effects in PBMCs of patients with RA. Probably, this reduction is due to an inhibitory effect of Losartan on NF-κB upregulated in RA patients modulating proinflammatory cytokines (54, 55).

Conclusion

In conclusion, our findings suggest that the Losartan therapy does modulate IFN-γ, IL-6, IL-17F and IL-22 at 100μM in PBMCs from RA patients according to disease activity. Moreover, none significative immunomodulatory activities were observed with Enalapril or Valsartan at 100μM in cytokine production, suggesting Losartan could be a better option for SAH treatment in RA patients. Further studies are still needed to elucidate the molecular mechanism that Losartan acts in PBMCs.

List of Abbreviations

Rheumatoid arthritis (RA)
Cardiovascular disease (CVD)
Systemic Arterial Hypertension (SAH)
Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS)
Activating Angiotensin type 1 (AT1)
Enalapril (E)
Losartan (L)
Valsartan (V)
Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)
Monoclonal Antibodies (mAB)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
Standard Deviation (SD)
American College of Rheumatology (ACR)
Disease Activity Score (DAS28)
Clinical Disease Activity Index (CDAI)
Stimulated Cells (SC)
Unstimulated Cells (UsC)
T helper (Th)

Conflict of interest
No competing interests were disclosed.

Acknowledgments
This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Instituto de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
M.Sc. Pablo Ramon Gualberto Cardoso (in vitro experiments, writing and statistical analysis); PhD. Andrea Tavares Dantas (patient recruitment and writing); PhD. Claudia Diniz Lopes Marques (patient recruitment and supervision); PhD. Angela Luzia Branco Pinto Duarte (patient recruitment and supervision and final decision); PhD. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (supervision and final decision); PhD. Ivan da Rocha Pitta (supervision, financial support); PhD. Maira Galdino da Rocha Pitta (supervision and final decision).

References

1. Vyas S, Bhalla AS, Ranjan P, Kumar S, Kumar U, Gupta AK. Rheumatoid Arthritis Revisited - Advanced Imaging Review. Pol J Radiol. 2016;81:629-35.
2. Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, et al. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. Arthritis Res Ther. 2004;6(2):R120-8.
3. Crepaldi G, Scirè CA, Carrara G, Sakellariou G, Caporali R, Hmamouchi I, et al. Cardiovascular Comorbidities Relate More than Others with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. PLoS One. 2016;11(1):e0146991.
4. Dougados M. Comorbidities in rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol. 2016;28(3):282-8.
5. Kitas GD, Gabriel SE. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. Ann Rheum Dis. 2011;70(1):8-14.
6. Midtbø H, Gerdts E, Kvien TK, Olsen IC, Lønnebakken MT, Davidsen ES, et al. The association of hypertension with asymptomatic cardiovascular organ damage in rheumatoid arthritis. Blood Press. 2016;25(5):298-304.
7. van Breukelen-van der Stoep DF, van Zeben D, Klop B, van de Geijn GJ, Janssen HJ, van der Meulen N, et al. Marked underdiagnosis and undertreatment of hypertension and hypercholesterolaemia in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2016;55(7):1210-6.
8. Maeda A, Okazaki T, Inoue M, Kitazono T, Yamasaki M, Lemonnier FA, et al. Immunosuppressive effect of angiotensin receptor blocker on stimulation of mice CTLs by angiotensin II. Int Immunopharmacol. 2009;9(10):1183-8.
9. Weber J, Tiriveedhi V, Takenaka M, Lu W, Hachem R, Trulock E, et al. Inhibition of renin angiotensin aldosterone system causes abrogation of obliterative airways disease through

inhibition of tumor necrosis factor-α-dependant interleukin-17. J Heart Lung Transplant. 2012;31(4):419-26.
10. Sanchez-Lemus E, Murakami Y, Larrayoz-Roldan IM, Moughamian AJ, Pavel J, Nishioku T, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. Endocrinology. 2008;149(10):5177-88.
11. Pereira IA, Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, Fronza LS, Bertolo MB, et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus on the management of comorbidities in patients with rheumatoid arthritis. Rev Bras Reumatol. 2012;52(4):474-95.
12. Liu X, Zhu X, Wang A, Fan H, Yuan H. Effects of angiotensin-II receptor blockers on experimental autoimmune myocarditis. Int J Cardiol. 2009;137(3):282-8.
13. Krysiak R, Okopień B. Different effects of perindopril and enalapril on monocyte cytokine release in coronary artery disease patients with normal blood pressure. Pharmacol Rep. 2012;64(6):1466-75.
14. Albuquerque D, Nihei J, Cardillo F, Singh R. The ACE inhibitors enalapril and captopril modulate cytokine responses in Balb/c and C57Bl/6 normal mice and increase CD4(+)CD103(+)CD25(negative) splenic T cell numbers. Cell Immunol. 2010;260(2):92-7.
15. Sepehri Z, Masoumi M, Ebrahimi N, Kiani Z, Nasiri AA, Kohan F, et al. Atorvastatin, Losartan and Captopril Lead to Upregulation of TGF-β, and Downregulation of IL-6 in Coronary Artery Disease and Hypertension. PLoS One. 2016;11(12):e0168312.
16. Sadamatsu K, Shimokawa H, Tashiro H, Seto T, Kakizoe H, Yamamoto K. Different effects of simvastatin and losartan on cytokine levels in coronary artery disease. Am J Cardiovasc Drugs. 2006;6(3):169-75.
17. Miura Y, Yamamoto N, Tsunekawa S, Taguchi S, Eguchi Y, Ozaki N, et al. Replacement of valsartan and candesartan by telmisartan in hypertensive patients with type 2 diabetes: metabolic and antiatherogenic consequences. Diabetes Care. 2005;28(3):757-8.
18. Yasuda T, Endoh M, Suzuki D, Yoshimura A, Ideura T, Tamura K, et al. Effects of valsartan on progression of kidney disease in Japanese hypertensive patients with advanced, predialysis, chronic kidney disease: Kanagawa Valsartan Trial (KVT). Hypertens Res. 2013;36(3):240-6.
19. Groenink M, den Hartog AW, Franken R, Radonic T, de Waard V, Timmermans J, et al. Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. Eur Heart J. 2013;34(45):3491-500.
20. Hernández-Fonseca JP, Durán A, Valero N, Mosquera J. Losartan and enalapril decrease viral absorption and interleukin 1 beta production by macrophages in an experimental dengue virus infection. Arch Virol. 2015;160(11):2861-5.
21. Nemati F, Rahbar-Roshandel N, Hosseini F, Mahmoudian M, Shafiei M. Anti-inflammatory effects of anti-hypertensive agents: influence on interleukin-1β secretion by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes from patients with essential hypertension. Clin Exp Hypertens. 2011;33(2):66-76.
22. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. Arthritis Res Ther. 2005;7(4):R796-806.
23. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1995;38(1):44-8.
24. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. J Immunol Methods. 2003;275(1-2):251-5.
25. Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Mus AM, van Driel M, Hazes JM, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by

memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2010;62(1):132-42.
26. 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. Ann Rheum Dis. 2010;69(9):1580-8.
27. Wang F, Huang L, Peng ZZ, Tang YT, Lu MM, Peng Y, et al. Losartan inhibits LPS + ATP-induced IL-1beta secretion from mouse primary macrophages by suppressing NALP3 inflammasome. Pharmazie. 2014;69(9):680-4.
28. Furst DE, Emery P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. Rheumatology (Oxford). 2014;53(9):1560-9.
29. Popkova TV, Khelkovskaia AN, Mach ES, Aleksandrova EN, Novikov AA, Novikova DS, et al. [Cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis]. Ter Arkh. 2007;79(5):9-14.
30. de Jong HJ, Vandebriel RJ, Saldi SR, van Dijk L, van Loveren H, Cohen Tervaert JW, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers and the risk of developing rheumatoid arthritis in antihypertensive drug users. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2012;21(8):835-43.
31. del Rincón I, Polak JF, O'Leary DH, Battafarano DF, Erikson JM, Restrepo JF, et al. Systemic inflammation and cardiovascular risk factors predict rapid progression of atherosclerosis in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2015;74(6):1118-23.
32. Zrioual S, Ecochard R, Tournadre A, Lenief V, Cazalis MA, Miossec P. Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synoviocytes. J Immunol. 2009;182(5):3112-20.
33. Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J, Wojciechowska B, Lacki JK, Maslinski S. Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RA). Scand J Immunol. 2010;72(2):134-41.
34. Hot A, Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. Ann Rheum Dis. 2011;70(5):727-32.
35. Bean C, Spencer SK, Bowles T, Kyle PB, Williams JM, Gibbens J, et al. Inhibition of T-cell activation attenuates hypertension, TNFα, IL-17, and blood-brain barrier permeability in pregnant rats with angiogenic imbalance. Am J Reprod Immunol. 2016;76(4):272-9.
36. Marder W, Khalatbari S, Myles JD, Hench R, Yalavarthi S, Lustig S, et al. Interleukin 17 as a novel predictor of vascular function in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2011;70(9):1550-5.
37. Norlander AE, Saleh MA, Kamat NV, Ko B, Gnecco J, Zhu L, et al. Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. Hypertension. 2016;68(1):167-74.
38. Ash Z, Emery P. The role of tocilizumab in the management of rheumatoid arthritis. Expert Opin Biol Ther. 2012;12(9):1277-89.
39. Qi YF, Huang YX, Wang HY, Zhang Y, Bao YL, Sun LG, et al. Elucidating the crosstalk mechanism between IFN-gamma and IL-6 via mathematical modelling. BMC Bioinformatics. 2013;14:41.
40. da Rocha Junior LF, Rêgo MJ, Cavalcanti MB, Pereira MC, Pitta MG, de Oliveira PS, et al. Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. Biomed Res Int. 2013;2013:926060.
41. Scarsi M, Zanotti C, Chiarini M, Imberti L, Piantoni S, Frassi M, et al. Reduction of peripheral blood T cells producing IFN-γ and IL-17 after therapy with abatacept for rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2014;32(2):204-10.

42. Lübbers J, Brink M, van de Stadt LA, Vosslamber S, Wesseling JG, van Schaardenburg D, et al. The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2013;72(5):776-80.
43. Yuan J, Wegenka UM, Lütticken C, Buschmann J, Decker T, Schindler C, et al. The signalling pathways of interleukin-6 and gamma interferon converge by the activation of different transcription factors which bind to common responsive DNA elements. Mol Cell Biol. 1994;14(3):1657-68.
44. Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. Nat Rev Rheumatol. 2014;10(12):720-7.
45. Baillet A, Gossec L, Paternotte S, Etcheto A, Combe B, Meyer O, et al. Evaluation of serum interleukin-6 level as a surrogate marker of synovial inflammation and as a factor of structural progression in early rheumatoid arthritis: results from a French national multicenter cohort. Arthritis Care Res (Hoboken). 2015;67(7):905-12.
46. Kim KW, Kim HR, Park JY, Park JS, Oh HJ, Woo YJ, et al. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 2012;64(4):1015-23.
47. Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, Ma N, Zhang Y, Feng L, et al. IL-22+ CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. 2013;16(5):518-26.
48. Zhu J, Jia E, Zhou Y, Xu J, Feng Z, Wang H, et al. Interleukin-22 Secreted by NKp44+ Natural Killer Cells Promotes Proliferation of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. Medicine (Baltimore). 2015;94(52):e2137.
49. Koenders MI, van den Berg WB. Novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis. Trends Pharmacol Sci. 2015;36(4):189-95.
50. Xie Q, Huang C, Li J. Interleukin-22 and rheumatoid arthritis: emerging role in pathogenesis and therapy. Autoimmunity. 2015;48(2):69-72.
51. Xie Q, Wang SC, Li J. Interleukin 22, a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2012;39(11):2220; author reply 1.
52. Pereira MC, Cardoso PR, Da Rocha LF, Rêgo MJ, Gonçalves SM, Santos FA, et al. Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis. Inflamm Res. 2014.
53. da Rocha LF, Duarte Â, Dantas AT, Mariz HA, Pitta IaR, Galdino SL, et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. J Rheumatol. 2012;39(7):1320-5.
54. Guo G, Cheng X, Fu R. Losartan Inhibits Nuclear Factor-κB Activation Induced by Small, Dense LDL Cholesterol Particles in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Curr Ther Res Clin Exp. 2014;76:17-20.
55. Pattacini L, Casali B, Boiardi L, Pipitone N, Albertazzi L, Salvarani C. Angiotensin II protects fibroblast-like synoviocytes from apoptosis via the AT1-NF-kappaB pathway. Rheumatology (Oxford). 2007;46(8):1252-7.

ANEXO A – FICHA CLÍNICA DE ATENDIMENTO DO AMBULATÓRIO DE REUMATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO

FICHA CLÍNICA ARTRITE REUMATOIDE

ID: ____ ____ ____ **Reg:_____**

Data de coleta: _____/_____/_____

Idade: _____ anos **Data de nascimento: ____/_____/_____**

Tempo de doença (anos): _____

Sexo: (1) masculino (2) feminino

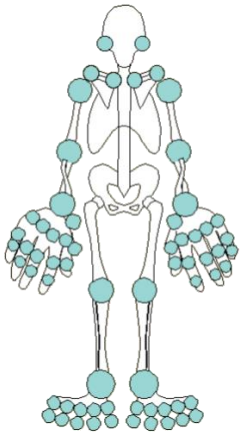
Etnia: (1) parda (2) negra (3) branca (4) amarela (5) indígena

Comorbidades: (1) DM (2) obesidade (3) Dislipidemia (4) Osteoporose

MEDICAMENTOS EM USO ATUAL **OU** ANTERIOR **(Marcar com** X **na última coluna da direita aqueles utilizados no dia da coleta)**

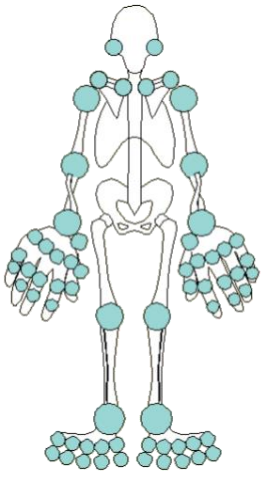
DROGA	**DOSE (dose/semana)**	**TEMPO (meses)**	**DOSE ATUAL (se em uso)**
1. Prednisona			
2. Metotrexato			
3. SSZ/HCQ			
4. Leflunomida			
5. Outros			

CONTAGEM ARTICULAR



DOLOROSAS:

_____



EDEMACIADAS:

_____

VSH =	**Fator Reumatoide=**
EVAp = mm	**EVAm= mm**
DAS28=	**CDAI =**

PCR_____ | Anti-CCP_____ | RX Erosão sim ( ) não ( )

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos CEP-CCS-UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro da Atividade Imunomoduladora dos Bloqueadores do Receptor de Angiotensina

Pesquisador: Pablo Ramon Gualberto Cardoso

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53555116.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.486.212

Apresentação do Projeto:

O projeto aqui relatado versa sobre uma proposta de doutorado a ser desenvolvido no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE pelo pesquisador Pablo Ramon Gualberto Cardoso, sob a orientação da Profa. Maira Galdino da Rocha Pitta. A temática abordada refere-se a uma proposta multidisciplinar e de impacto científico sobre a relação entre a artrite reumatóide (AR) e as doenças cardiovasculares (DCV). Evidências recentes demonstram o papel da inflamação no desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica (HAS). Mecanismos da imunidade inata, células T efetoras e regulatórias e ainda, moléculas co-estimulatórias parecem estar envolvidos na etiopatogênese da HAS, interagindo em sua maior parte com o sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA), principal responsável pela regulação da pressão arterial e do balanço hídrico. Deste modo, qual seria a magnitude do efeito imunomodulador dos BRA's no soro de pacientes com AR? Caso seja demonstrado que os BRA's são capazes de inibir in vitro a produção de citocinas da via Th17, poderiam ter um papel auxiliar no tratamento de pacientes com AR.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a atividade imunomoduladora in vitro dos bloqueadores do receptor da angiotensina II (BRA's)(losartana e valsartana) e do inibidor da ECA (enalapril)Determinação da dose não tóxica

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

dosBRA's, Metotrexatoe do enalapril em PBMCs provenientes de voluntários
Avaliar o efeitoin vitro dos BRA's, Metotrexato e enalapril sobre a produção das citocinas da via Th17 - IL-6, IL-17 A e F, IL-22, IL-23 e TNFem PBMCs provenientes de voluntários e pacientes portadores de AR Avaliar o efeitoin vitro dos BRA's, Metotrexato e enalapril sobre a inibição do fator de transcrição NFB em PBMCs provenientes de voluntários e pacientes portadores de AR Comparar o efeito dos BRA's (em associação e não com o Metotrexato) com o inibidor da ECA (enalapril) no perfil de citocinas em pacientes com AR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar um pequeno hematoma, que é uma área arroxeada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Caso ocorra a formação do hematoma, será aplicada compressa gelada para reduzir a vermelhidão.

Os benefícios da pesquisa não se restringem ao indivíduo, estendendo-se a sociedade como um todo, uma vez que os resultados obtidos poderão propiciar um maior conhecimento sobre a etiopatogênese e tratamento da Artrite Reumatóide. Sendo assim, permitirá não só um melhor entendimento da doença como a possibilidade da identificação de novos alvos terapêuticos, para uma doença comum na população mundial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para a execução das diversas atividades necessárias do projeto serão incluídos pacientes portadores de artrite reumatoide (AR), selecionados do ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE e em seguida avaliados no de Pesquisa Clínica do Serviço do mesmo hospital, sob a coordenação da Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, professora titular da disciplina de reumatologia da UFPE. Desses pacientes será coletado sangue para determinar os níveis séricos das citocinas da via Th17 (IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23 e TNF) após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 e para avaliar como estas células respondemapós a adição in vitro dos inibidores do receptor da angiotensina II (BRA's) – losartana e valsartana. Os ensaios biológicos serão realizados no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG) da UFPE e coordenados pela Profa. Dra Maira Galdino da Rocha Pitta, professora adjunta/DE da UFPE. A avaliação clínica dos participantes e a coleta de material biológico serão realizadas no ambulatório de artrite reumatoide do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE. Todo material biológico coletado será armazenado em freezer com temperatura a -70C, localizado no

Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) para posterior análise. A amostra será composta por40 indivíduos com ARe 40 voluntários sadios.
Os indivíduos com AR serão selecionados aleatoriamente de acordo com o atendimento do ambulatório, durante o período do estudo, através dos critérios de inclusão e exclusão. O orçamento da pesquisa é de R$ 26.631,27 e será de inteira responsabilidade do pesquisador principal em conjunto com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica, presidido pelo Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta. O recrutamento de pacientes será iniciado a partir de junho de 2016.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Os participantes da pesquisa serão selecionados no HC, a folha de rosto é assinada pelo professor Luiz Alberto Lira Soares, Vice coordenador do PPGIT. A carta de anuência da EBSERH está assinada pela Chefe do serviço de reumatologia (Angela Duarte)e pelo chefe da unidade de gerenciamento da produção científica (Prof. Décio Medeiros). TCLE de acordo como preconizado e Anuência do NUPIT, INCT e HC.

Recomendações:
Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_657114.pdf	07/04/2016 13:44:12		Aceito
Outros	CARTADERESPOSTAASPENDENCIAS.docx	07/04/2016 13:43:58	Pablo Ramon Gualberto Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	07/04/2016 13:43:16	Pablo Ramon Gualberto Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOBRA_Pablo.docx	25/02/2016 22:48:32	Pablo Ramon Gualberto Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBRANOVO.docx	25/02/2016 22:48:12	Pablo Ramon Gualberto Cardoso	Aceito

Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaINCT.pdf	25/02/2016 22:47:54	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaNUPIT.pdf	25/02/2016 22:47:41	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesMoacyrRego.pdf	24/02/2016 18:20:40	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesMichellyPereira.pdf	24/02/2016 18:20:25	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesMairaPitta.pdf	24/02/2016 18:20:08	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesLaurindoJunior.pdf	24/02/2016 18:19:50	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesIvanPitta.pdf	24/02/2016 18:19:35	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesClaudiaMarques.pdf	24/02/2016 18:19:14	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesAngelaDuarte.pdf	24/02/2016 18:17:47	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesAndreaDantas.pdf	24/02/2016 18:17:31	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Outros	LattesPabloCardoso.pdf	24/02/2016 18:17:06	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Cronograma	CronogramaDetalhado.docx	24/02/2016 18:12:10	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Orçamento	OrcamentoDetalhado.docx	24/02/2016 18:11:09	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaHCAssinada.pdf	24/02/2016 18:09:31	Pablo Ramon Guelberto Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 11 de Abril de 2016

Assinado por:

Gisele Cristina Sena da Silva Pinho

(Coordenador)