**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Patrícia Rolim Mendonça Lôbo

**Avaliação dos metabólitos do triptofano e do polimorfismo do gene da
indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) na etiopatogênese da artrite reumatoide**

**RIBEIRÃO PRETO
2018**

PATRÍCIA ROLIM MENDONÇA LÔBO

Avaliação dos metabólitos do triptofano e do polimorfismo do gene da indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) na etiopatogênese da artrite reumatoide

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: investigação clínica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior

RIBEIRÃO PRETO
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lôbo, Patrícia Rolim Mendonça

Avaliação dos metabólitos do triptofano e do polimorfismo do gene da indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) na etiopatogênese da artrite reumatoide. Ribeirão Preto, 2018.

181p.: il: 1,79 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior

1. Artrite Reumatoide. 2. Polimorfismo genético. 3. IDO1. 4. Triptofano. 5. Via das quinureninas. 6. Serotonina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lôbo, Patrícia Rolim Mendonça

Título: Avaliação dos metabólitos do triptofano e do polimorfismo do gene da indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) na etiopatogênese da artrite reumatoide

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em
Ciências Médicas

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, Rômulo, amor e amigo, parceiro de todas as horas, por estar ao meu lado nessa jornada, por todos os sonhos compartilhados e por iluminar meus dias com cores e possibilidades.

À minha mãe, Inez, doação e amor desde os meus primeiros passos, pelos ensinamentos, por ser exemplo de humildade, fé, generosidade e dedicação.

À minha irmã, Priscilla, sempre presente, pelo apoio, carinho, incentivo e amizade inestimáveis.

Ao Carlos, aos meus cunhados, sogros, sobrinhos e demais familiares por me lembrarem que família é ajuda, compreensão e acolhida.

Ao pequeno que está para chegar, por desde tão cedo reafirmar que sonhos não podem esperar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Paulo Louzada Júnior, exemplo como pesquisador e docente, por toda orientação, ajuda, diponibilidade e paciência nas minhas dúvidas com os assuntos da tese e da vida.

A todos os pacientes que aceitaram participar do estudo, pela disposição e doação, sem os quais não seria possível a concretização deste estudo.

Ao inicialmente preceptor da residência e posteriormente amigo, Renê, por todo o apoio nos meus dias em Ribeirão Preto e, até hoje, pela suas competência e disponibilidade exemplares sempre que procurei por ajuda.

Aos meus exemplos na Reumatologia, amigos inesquecíveis, que sempre me apoiaram e estimularam na busca por aprimoramento: Petean, Fabíola, Renê, Maria Carolina, Sérgio, Rodrigo, Luppino e Lucienir.

Aos funcionários do CEDMAC, especialmente Fernanda, Mirela, Carol, Elisete, Miriam e Alessandra, que me ajudaram nas etapas de recrutamento de pacientes e coleta de amostras, dividindo comigo as dificuldades do dia a dia.

Aos funcionários, enfermeiros e auxiliares do Centro de Reabilitação e do "balcão 6" do Hospital das Clínicas e dos ambulatórios e enfermarias do Hospital Estadual de Ribeirão Preto, pela ajuda nas coletas de amostras.

Aos residentes de Clínica Médica e Reumatologia que permitiram a entrada nas salas de atendimento para conversar com pacientes e incluí-los no estudo.

Ao laboratório de Imunologia do HCFMRP e aos seus funcionários, Rubens, Basílica, Juliana, Muriel, ao Hemocentro de Ribeirão Preto e à Neifi, por todo suporte e ajuda dispensados para realização desse projeto.

À equipe do laboratório Multiusuário, em especial a técnica de laboratório e amiga Stella, por terem disponibilizados tempo, paciência e conhecimentos.

Ao Prof. Norberto Poperine Lopes e à pós-graduanda Gabriela Buqui, do Núcleo de pesquisa em produtos naturais e sintéticos da Faculdade das Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, por compartilharem suas experiências e dependências para colaboração com a pesquisa.

Ao Hospital Estadual de Ribeirão Preto, por ter apoiado o projeto, pela oportunidade de trabalhar como médica nos anos do doutorado em que estive em Ribeirão Preto e por proporcionar o convívio com amigos tão queridos, que me escutaram e apoiaram nos dias mais difíceis.

Ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, por ter contribuído com o projeto e com minhas formações médica e pessoal, por ter me proporcionado momentos inesquecíveis com pacientes, familiares, colegas médicos e demais funcionários, com as quais troquei conversas e experiências que me motivaram e ainda me motivam todos os dias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através do Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão – Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias – pelo estímulo à pesquisa e pelo apoio financeiro.

Aos amigos de ontem e de hoje, os que apoiam com palavras de otimismo ou com a simples escuta, e aqueles que, na lembrança, fazem os dias mais leves.

A todos os lugares e pessoas que conheci e que me inspiraram a compartilhar, buscar, persistir e evoluir; e a Deus, que me trouxe fé e me mostrou anjos em forma de pessoas para me ajudar nesse projeto.

RESUMO

LÔBO, P.R.M. **Avaliação dos metabólitos do triptofano e do polimorfismo do gene da indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) na etiopatogênese da artrite reumatoide.** 2018. 181f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A artrite reumatoide (AR) é a artropatia inflamatória mais prevalente no mundo, de etiologia multifatorial e fenótipos heterogêneos. Busca-se, além de definir fatores etiológicos, compreender as interações entre mecanismos envolvidos na fisiopatologia da AR. Entre estes, fatores genéticos, tanto genes do antígeno leucocitário humano (HLA), especialmente a presença do epítipo compartilhado (*Shared epitope* – SE) do HLA-DRB1, como genes não-HLA, e fatores ambientais e epigenéticos têm sido associados à doença. Assim, a identificação de novos fatores relacionados à etiopatogenia da AR e suas possíveis associações com características clínicas motivaram esse estudo. Um estudo caso-controle foi desenhado e dividido em duas etapas. Para a primeira etapa, foi obtido plasma de 18 indivíduos de AR e 18 voluntários saudáveis de Ribeirão Preto, no qual foram identificados quinurenina (Kyn), Trp, serotonina (5-HT) e taxa Kyn/Trp (KTR) por cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE) acoplada a espectrômetro de massas sequencial (CLUE-DAD-EM/EM). Na segunda etapa, de estudo genético, uma coorte formada por 328 indivíduos com AR e por 234 voluntários saudáveis de Ribeirão Preto e de Porto Alegre foi avaliada quanto ao polimorfismo do gene da enzima indoleamine 2,3-dioxigenase 1 (IDO1). Foram obtidos dados clínicos e epidemiológicos e coletadas amostras de sangue periférico para extração de DNA pelo método de *salting-out*. Em seguida, tipificação HLA e reação em cadeia de polimerase (RCP) das variantes da IDO1, rs7820268, rs3739319, rs61753677, rs35059413, rs35099072 e rs9298586, foram realizadas. A positividade para fator reumatoide (FR) em indivíduos com AR foi associada ao tabagismo ($p = 0.0002$) e ao SE ($p < 0.0001$), e para anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), associado ao SE ($p < 0.0001$). Quando combinadas a presença de SE e a de tabagismo, houve associação estatisticamente significativa para FR ($p < 0.001$) e para anti-CCP ($p = 0.03$). Foram observadas menores concentrações plasmáticas de 5-HT em indivíduos com AR quando comparados a voluntários saudáveis ($p =$

0.006), mas sem diferença para níveis de Trp, Kyn e KTR. Para estes, diferenças apareceram quando avaliados subgrupos. Em indivíduos com AR sem tratamento com drogas modificadoras do curso da doença (DMCDs), os valores plasmáticos de Trp foram menores quando comparados aos em terapia ($p = 0.0016$), enquanto em pacientes com AR tabagistas os valores de Kyn e KTR foram menores que em pacientes não tabagistas ($p = 0.039$ e $p = 0.032$, respectivamente). Não foram identificadas associações estatisticamente significantes entre as variantes genéticas estudadas e o risco de desenvolver AR, nem entre os polimorfismos da IDO1 estudados e a concentração plasmática de Trp, Kyn e 5-HT e KTR. Este estudo não identificou relação das variantes do gene da IDO1 com suscetibilidade para AR. Assim, novos estudos são necessários para que possam ser explicadas as associações encontradas na via das Kyns e na 5-HT em etiopatogenia da AR.

Palavras-chave: Artrite reumatoide. Etiopatogenia. Indoleamine 2,3-dioxigenase1. Polimorfismo genético. Triptofano. Quinurenina. Serotonina.

ABSTRACT

LÔBO, P.R.M. Evaluation of tryptophan metabolites and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) gene polymorphism in rheumatoid arthritis etiopathogenesis. 2018. 181f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Rheumatoid arthritis (RA) is the most prevalent inflammatory arthropathy in the world, with multifactorial etiology and heterogeneous phenotypes. Besides defining etiological factors, it is sought to understand the interactions between mechanisms in RA pathophysiology. About these, genetic factors, both human leucocyte antigen (HLA) genes, especially the HLA-DRB1 Shared epitope (SE) presence, and not-HLA genes, and environmental and epigenetics factors have been associated with the disease. Therefore, the aim of this study was to identify new possible associations between RA clinical features and its etiopathogenesis. A case-control study was designed and it was divided in two phases. The first phase, it was obtained plasma of 18 RA patients and 18 healthy controls from Ribeirão Preto to identify the kynurenine (Kyn), Trp and serotonin (5-HT) concentrations and Kyn/Trp ratio (KTR) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometer. The second phase was a genetic study that evaluated a cohort of 328 RA patients and 234 healthy volunteers from Ribeirão Preto and Porto Alegre about the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) gene polymorphism. Clinical and epidemiological data were obtained and peripheral blood samples were collected to DNA extraction by salting-out method. Then, HLA typification and polymerase chain reaction to identify IDO1 genetic variants rs7820268, rs3739319, rs61753677, rs35059413, rs35099072 and rs9298586 were performed. Rheumatoid factor (RF) positivity was associated to smoking ($p = 0.0002$) and SE ($p < 0.0001$), and cyclic citrullinated peptide auto-antibodies (anti-CCP) positivity was associated to SE ($p < 0.0001$). When SE presence and smoking were combined, there was statistically significant association to RF ($p < 0.001$) and anti-CCP ($p = 0.03$). We observed lower plasma 5-HT concentrations in RA patients than in healthy volunteers ($p = 0.006$), but no significant difference to Trp, Kyn and KTR levels. For these, differences were observed when subgroups were evaluated. In RA patients not using disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) the plasma Trp levels were lower than RA

patients using DMARDs, while the plasma Kyn concentrations and KTR in smokers RA patients were lower than nonsmokers RA patients ($p = 0.039$ and $p = 0.032$ respectively). We did not identify statistically significant associations neither between studied genetic variants and risk to develop RA nor between IDO1 polymorphisms and plasma Trp, Kyn, 5HT concentrations and KTR. This study did not identify relation between IDO1 genetic variants with susceptibility to RA. Therefore, new studies are necessary to explain the searched associations between Kyns pathway and 5-HT in RA etiopathogenesis.

Key-words: Rheumatoid arthritis; Etiopathogenesis; Indoleamine 2,3-dioxygenase 1; genetic polymorphism; Tryptophan; Kynurenine; Serotonin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fases da AR	41
Figura 2 -	Algoritmo de tratamento para AR	44
Figura 3 -	Triptofano. Em destaque o anel indol	45
Figura 4 -	Via das quinureninas e metabolismo do L-triptofano.....	46
Figura 5 -	Estrutura da molécula humana da enzima IDO1	48
Figura 6 -	Representação esquemática do gene que codifica a IDO1	49
Figura 7 -	Fluxograma da coleta de dados para o estudo genético.....	60
Figura 8 -	Fluxograma da coleta de dados para o estudo dos metabólitos do Trp	61
Figura 9 -	Representação esquemática do gene da IDO1 com as variantes estudadas.....	65
Figura 10 -	Gráfico apresentando as concentrações plasmáticas da Kyn nos grupos de AR e de indivíduos controles.....	80
Figura 11 -	Gráfico das concentrações plasmáticas do Trp nos grupos de AR e de indivíduos controles.....	80
Figura 12 -	Gráfico apresentando as concentrações plasmáticas da KTR (Kyn/Trp) nos grupos de AR e de indivíduos controles.....	81
Figura 13-	Gráfico apresentando as concentrações plasmáticas da 5-HT nos grupos de AR e de indivíduos controles.....	81

Figura 14 -	Discriminação alélica do genótipo heterozigoto CT para o rs7820268.....	102
Figura 15 -	Representação dos <i>clusters</i> para o rs7820268.....	102

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.1	Índices compostos de atividade da doença e critérios de remissão pelo ACR/ EULAR.....	42
Tabela 1.2 –	Distribuição e expressão de receptores de serotonina (5-HT) (5-HTRs) em células imunes de humanos e de murinos.....	52
Tabela 3.1 –	Gradiente de fase móvel utilizado no método por CLUE-DAD-EM/EM para análise simultânea de 5-HT, TRP e KYN.	62
Tabela 3.2 –	Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação de 5-HT, TRP e KYN.....	63
Tabela 3.3 –	Parâmetros do método MRM para quantificação simultânea de 5-HT,TRP e KYN (modo positivo de ionização)	63
Tabela 3.4-	Caracterização dos polimorfismos do gene da IDO1 estudados	64
Tabela 3.5 –	O critério de resposta EULAR baseado no DAS28	72
Tabela 4.1 –	Parâmetros clínicos e laboratoriais dos indivíduos do grupo de AR (n=18).....	77
Tabela 4.2 –	Parâmetros clínicos e laboratoriais dos indivíduos controles (n=18)	78
Tabela 4.3 –	Comparação dos parâmetros clínicos entre grupos de AR e controles saudáveis.....	78
Tabela 4.4.-	Descrição do perfil de distribuição das concentrações plasmáticas dos metabólitos do Trp, estudados no grupo de indivíduos de AR e de controles.....	79

Tabela 4.5 –	Comparação de parâmetros clínicos e laboratoriais, metabólitos do TRP e atividade da IDO1 (KTR) entre grupos de AR e controles saudáveis.....	82
Tabela 4.6 –	Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e os da KTR dos indivíduos com AR, segregados quanto ao uso de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS)	83
Tabela 4.7 –	Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR quanto à presença de FR.....	84
Tabela 4.8 –	Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR quanto à presença do anti-CCP	84
Tabela 4.9 –	Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR quanto à positividade para FR e anti-CCP	85
Tabela 4.10.–	Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, segregados em tabagistas e não-tabagistas	85
Tabela 4.11 –	Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à presença do SE	86
Tabela 4.12 –	Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à doença em remissão e baixa atividade, e em moderada e alta atividade.....	87
Tabela 4.13 –	Comparação entre os perfis de KTR e os metabólitos do Trp, em indivíduos com AR com doença em remissão e em não remissão.....	87

Tabela 4.14 –	Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e KTR em indivíduos com AR, quanto à presença ou à ausência de tratamento com MMCD	88
Tabela 4.15 –	Comparação entre os perfis de KTR e metabólitos do Trp em indivíduos com AR segregados quanto ao tipo de MMCD utilizado	89
Tabela 4.16 –	Comparação entre os perfis dos metabólitos do Trp e da KTR entre indivíduos com e sem o alelo mutado para o SNP rs7820268	89
Tabela 4.17 –	Comparação entre os perfis dos metabólitos do Trp e da KTR entre indivíduos carreadores e não carreadores do alelo mutado para o SNP rs3739319.....	90
Tabela 4.18 –	Comparação entre os perfis dos metabólitos do Trp e da KTR entre indivíduos carreadores e não carreadores do alelo mutado para o SNP rs9298586.....	90
Tabela 4.19 –	Caracterização dos indivíduos de AR procedentes de Ribeirão Preto e de Porto Alegre segundo características demográficas e fatores prognósticos	91
Tabela 4.20 –	Caracterização clínico-laboratorial do grupo AR de Ribeirão Preto.....	93
Tabela 4.21 -	Parâmetros clínicos e laboratoriais do grupo AR de Porto Alegre	94
Tabela 4.22 -	Caracterização dos grupos AR e controles saudáveis segundo características demográficas e presença de tabagismo em Ribeirão Preto	95

Tabela 4.23 -	Caracterização dos grupos AR e controles saudáveis segundo características demográficas e presença de tabagismo em Porto Alegre	96
Tabela 4.24 -	Caracterização dos grupos AR e controles saudáveis segundo características demográficas e presença de tabagismo em ambas cidades	96
Tabela 4.25 -	Análise de exposição a tabagismo e presença do epitopo compartilhado (SE) e risco de positividade para fator reumatoide (FR) em indivíduos de AR de Ribeirão Preto (n=171)	97
Tabela 4.26 -	Análise de exposição ao tabagismo e à presença do epítipo do compartilhado (SE) e risco de positividade para anti-CCP em indivíduos de AR de Ribeirão Preto (n=171).....	98
Tabela 4.27 -	Análise de exposição a tabagismo e presença do epítipo compartilhado (SE) e risco de positividade para fator reumatoide (FR) em indivíduos de AR de Porto Alegre (n=157)	98
Tabela 4.28 -	Análise de exposição a tabagismo e presença do epítipo compartilhado (SE) e risco de positividade para anti-CCP em indivíduos de AR de Porto Alegre (n= 157).....	99
Tabela 4.29 -	Análise de exposição ao tabagismo e à presença do epítipo compartilhado (SE), e o risco de positividade para fator reumatoide (FR) em indivíduos de AR em ambas as cidades (n= 328)	99
Tabela 4.30 -	Análise de exposição a tabagismo e à presença do epítipo compartilhado (SE), e o risco de positividade para anti-CCP em indivíduos de AR ambas as cidades (n= 328).....	100

Tabela 4.31 -	Relação entre exposição a tabagismo, presença do epítipo compartilhado(SE) e risco de apresentar FR ou anti-CCP positivos	101
Tabela 4.32 -	Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos do gene da IDO1 selecionados nas amostras de Ribeirão Preto e Porto Alegre	103
Tabela 4.33 -	Distribuição das frequências genotípicas esperadas e observadas dos polimorfismos no gene da população com AR e dos indivíduos controles no grupo formado pelas amostras de Porto Alegre e de Ribeirão Preto	104
Tabela 4.34 -	Avaliação sobre a associação entre polimorfismo da IDO1 e a presença de AR na amostra total de indivíduos de Ribeirão Preto e Porto Alegre	105
Tabela 4.35 -	Avaliação sobre a associação entre polimorfismo da IDO1 e a presença de (fator reumatoide) FR em pacientes com AR na amostra total de indivíduos de Ribeirão Preto e de Porto Alegre	106
Tabela 4.36 -	Avaliação sobre a associação entre polimorfismo da IDO1 e a presença de anti-CCP, em pacientes com AR, na amostra total de indivíduos de Ribeirão Preto e de Porto Alegre	106
Tabela 4.37 -	Avaliação sobre a associação entre polimorfismos da IDO1 quanto à presença do epítipo compartilhado (SE) na população com AR de Ribeirão Preto e de Porto Alegre (N = 306)	107
Tabela 4.38 -	Distribuição das frequências genotípicas quanto ao grau de atividade da doença (DAS28) na população com AR de Ribeirão Preto (n=168)	108

Tabela 4.39 -	Avaliação sobre a associação entre os polimorfismos quanto ao grau de atividade da doença (DAS28) na população com AR de Ribeirão Preto (n = 168).....	109
Tabela 4.40 -	Avaliação sobre a associação entre polimorfismos, quanto à remissão da doença, na população com AR de Ribeirão Preto (n = 168)	110
Tabela 4.41 -	Avaliação sobre a associação entre polimorfismos quanto à resposta ao metotrexato (MTX) nos primeiros três meses de tratamento na população com AR de Ribeirão Preto (n= 168)	111
Tabela 4.42 -	Distribuição das frequências dos polimorfismos em relação ao tabagismo na população com AR de Ribeirão Preto e de Porto Alegre	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aas	Aminoácidos
AADC	Descarboxilase-Aminoácido-Aromático
ACPAs	Anticorpos Contra Antígenos Proteicos Citrulinados
ACR	Colégio Americano de Reumatologia (<i>American College of Rheumatology</i>)
AD	Articulações Dolorosas
AE	Articulações Edemaciadas
AhR	Receptor de Hidrocarboneto Arila
anti-CCP	Anticorpo Contra Peptídeo Cíclico Citrulinado
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (<i>Antigen Presenting Cells</i>)
APRIL	<i>Proliferation-Inducing Ligand</i>
AR	Artrite Reumatoide
ATP	Adenosina Trifosfato
BLyS	<i>B-lymphocyte stimulator</i>
CCR6	Receptor De Quimiocina Do Tipo 6 (<i>Chemokine Receptor 6</i>)
CDAI	<i>Clinical Disease Activity Index</i>
CD-39	<i>Cluster</i> de Diferenciação 39
CD73	<i>Cluster</i> de Diferenciação 73
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLEC16A	Gene que Codifica a Lecitina Tipo C Família 16A
CLUE	Cromatografia Líquida De Ultra-Eficiência
CLUE-DAD-EM/EM	Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência Acoplada a Espectrômetro de Massas Sequencial
CLYBL	Gene que Codifica a Enzima Mitocondrial Citramalil-CoA Liase
CTLA-4	Proteína-4 Citotóxica De Linfócito T
CXCL(número)	Quimiocina cuja Estrutura tem 2 cisteínas separadas por outro aminoácido
DAS-28	escore de atividade da doença baseado em 28 articulações (<i>Disease Activity Score- 28 joints</i>)
DCs	Células Dendríticas (<i>Dendritic Cells</i>)
DAI	Doença Autoimune
EA	Espondilite Anquilosante

EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EULAR	Liga Européia Contra o Reumatismo (<i>European League Against Rheumatism</i>)
EVA	Escala Visual Analógica
FICZ	6-Formilindole [3,2-B] Carbazole
FLS	Estroma de Sinoviócitos Tipo Fibroblastos (<i>fibroblast-like synoviocytes</i>)
FR	Fator Reumatóide
GM-CSF	Fator de Estimulação de Colônia De Granulócitos-Monócitos
GNF351	N-[2-(3H-Indol-3-Yl)Ethyl]-9-Isopropyl-2-(5-Methyl-3-Pyridyl)Purin-6-Amine
GWAS	Estudos de Associação Pangenômico (<i>Genome-Wide Association Study</i>)
ICs	Imunocomplexos
IC	Intervalos de Confiança
ICADs	Índices Compostos de Atividade da Doença
IDO1	Enzima Indoleamine 2,3-Dioxigenase 1
IDO	Indoleamina 2,3-Dioxigenase
IFN	Interferon
IgG	Fração Fc Da Imunoglobulina G
IL	Interleucina
lncRNA	RNA Não Codificados Longos
ISRS	Inibidores Seletivos Da Recaptação De Serotonina
HAQ	Questionário de Avaliação de Saúde Funcional (<i>Health Assessment Questionnaire</i>)
HCPA	Hospital das Clínicas de Porto Alegre
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
HERP	Hospital Estadual de Ribeirão Preto
HIF1— α	Fator 1-A Induzível Por Hipóxia
hnRNP A2/B1	Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea A2/B1
HLA	antígeno leucocitário humano (Human Leukocyte Antigen)
Kyns	Quinureninas

KTR	Razão Kyn/Trp
L-Trp	L-triptofano
MAF	Menor Frequência Alélica (<i>Minor Allele Frequency</i>)
MGB	<i>Minor Groove Binding</i>
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
miRNAs	microRNAs
MMCD	Medicamento Modificador do Curso da Doença
MNF	3'-metoxi-4'-nitroflavona
mRNA	RNA mensageiro
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MTHFR	Receptor da Metilenotetrahidrofolato Redutase (<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase Receptor</i>)
MTX	Metotrexato
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NK	Células T Natural Killer (<i>Natural Killer Cells</i>)
NPPS	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
OPG	Osteoprotegerina
OR	Odds Ratio
PAD	Enzima Peptidil-Arginina-Deaminase
PAIs	Provas de Atividade Inflamatória
PCR	Proteína C Reativa
PMNs	Leucócitos Polimorfonucleares
PTPN22	Proteína Tirosina Fosfatase número 22
QKRAA	Glutamina-Leucina-Arginina-Alanina-Alana
RANKL	Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B ligante (<i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>)
RASFs	Sinoviócitos Tipo-Fibroblastos da AR (<i>Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts</i>)
REM1	Triggering Receptor Expressed By Myeloid Cells 1
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RT-PCR	Reação De Cadeia de Polimerase em Tempo Real (<i>Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time</i>)
SAPE	Estreptovidina-Ficoetrina

SCV	Sistema Cardiovascular
SDAI	Índice Simplificado de Atividade da doença (<i>Simplified Disease Activity Index</i>)
SE	Epítopo Compartilhado (<i>Shared Epitope</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNPs	Polimorfismo De Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
STAT3	Sinal de Transdução E Ativação De Transcrição 3
STAT4	Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição 4 (<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 4</i>)
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-P-Dioxina
TDO	Triptofano 2,3-Dioxigenase
TGF	Fator de Transformação do Crescimento
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Linfócito T Cd 4+ Helper
Th9	nova célula T efetora que secreta IL-9
TLR	Receptores Tipo-Toll (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFAIP3	Proteína 3 Induzida pelo TNF- α (<i>Tumor Necrosis Factor Alpha Inducible Protein 3</i>)
TPH	Hidroxilase-Trp
TREM1	<i>Triggering Receptor Expressed By Myeloid Cells 1</i>
Tregs	Linfócito T CD 4+ Helper Regulatórias
Trp	Triptofano
TTS	Triptofanil-tRNA-Sintetase
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
US	Ultrassonografia
VEGF-A	Fator A de Crescimento de Endotélios Vasculares
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
5-HT	Serotonina (<i>5-hydroxytryptamine, 5-HT</i>)
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5-HTRs	Receptores de Serotonina

LISTA DE SÍMBOLOS

T	Temperatura
°C	Celsius
NaCl	Cloreto de Sódio
NaClO ₄ H ₂ O	Perclorato de Sódio
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
mg/dl	miligramas por decilitro
mm ³	Milímetro cúbico
µmol/L	Mol por litro
ng/ml	Nanograma por mililitro
SNP:	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
OR:	Odds Ratio
IC:	Intervalo de Confiança
NA	Não se Aplica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 Artrite Reumatoide	29
1.1.1 <i>Participação das respostas imune inata e adaptativa.....</i>	29
1.1.2 <i>Etiopatogênese</i>	35
1.1.2.1 Fatores de risco genéticos	35
1.1.2.2 Fatores de risco ambientais	38
1.1.2.3 Fatores de risco epigenéticos	39
1.1.3 <i>Evolução clínica e seguimento</i>	40
1.2 Vias de metabolização do triptofano	44
1.3 A enzima IDO1	47
1.4 Participação dos metabólitos do Trp na resposta imune.....	50
1.5 Justificativa do estudo.....	53
2 OBJETIVOS	55
3 INDIVÍDUOS, MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 Tipo de estudo	58
3.2 Seleção dos indivíduos.....	58
3.3 Coleta de dados e caracterização dos grupos	59
3.4 Estudo dos metabólitos do Trp.....	61
3.4.1 <i>Seleção dos metabólitos do Trp a serem avaliados</i>	61
3.4.2 <i>Separação e preparação do plasma.....</i>	61
3.4.3 <i>Quantificação de Trp, Kyn e 5-HT</i>	62
3.5 Estudo genético.....	64
3.5.1 <i>Seleção das variantes do gene da IDO</i>	64
3.5.2 <i>Extração do DNAg</i>	65
3.5.3 <i>Análise das variantes do gene da IDO1 por reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)</i>	66
3.5.4 <i>Tipificação do HLA-DR</i>	67
3.6 Definição de variáveis.....	70
3.6.1 <i>Variáveis independentes.....</i>	70
3.6.2 <i>Variáveis dependentes</i>	70
3.6.3 <i>Variável moderadora.....</i>	73
3.7 Análise estatística	73
3.8 Considerações éticas.....	74

3.9	Financiamento	74
4	RESULTADOS	75
4.1.	Estudo dos metabólitos do Trp.....	76
4.1.1	Análise descritiva dos dados clínicos e laboratoriais.....	76
4.1.2	Descrição dos níveis plasmáticos dos metabólitos do Trp	79
4.1.3	Comparação dos grupos de AR e de controles saudáveis quanto a aspectos demográficos, clínicos, laboratoriais, metabólitos do Trp e atividade da IDO	82
4.1.4	Comparação do perfil de metabólitos do Trp estudados e da KTR em indivíduos com AR, quanto à presença de anticorpos	84
4.1.5	Comparação do perfil de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à presença de tabagismo	85
4.1.6	Comparação do perfil de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à presença do SE	86
4.1.7	Comparação do perfil de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto ao grau de atividade inflamatória (DAS28).....	86
4.1.8	Análise do perfil de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à terapia com MMCDs.....	88
4.1.9	Comparação entre os parâmetros de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos que apresentam ou não o alelo mutado dos SNPs da IDO1 estudados	89
4.2	Estudo genético.....	91
4.2.1	Análise descritiva dos dados demográficos e clínicos.....	91
4.2.2	Associação entre presença de tabagismo e SE e positividade para FR e anti-CCP	97
4.2.3	Discriminação alélica individual	102
4.2.4	Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos do gene IDO1	103
4.2.5	A distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos do gene IDO1 e o equilíbrio de Hardy-Weinberg	103
4.2.6	Associação dos polimorfismos do gene da IDO1 e com a presença de AR	105
4.2.7	Associação dos polimorfismos do gene da IDO1 e positividade para FR e para anti- CCP	105
4.2.8	Associação dos polimorfismos do gene da IDO1 com a presença do epítipo compartilhado (SE)	107
4.2.9	Associação entre polimorfismos do gene IDO1 e grau de atividade da doença pelo DAS28.....	108
4.2.10	- Associação entre os polimorfismos do gene IDO1 e a resposta ao tratamento com metotrexato após três meses de início.....	110

4.2.11 - Comparação das variantes genéticas da IDO1 quanto à presença de tabagismo	111
5 DISCUSSÃO	113
REFERÊNCIAS	132
ANEXOS.....	167
Anexo A - Critérios de Classificação para AR ACR/EULAR 2010	168
Anexo B - Critérios revisados do ACR 1987 para classificação da AR	169
Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes com Artrite Reumatoide	170
Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para guarda de material biológico	172
Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para voluntários saudáveis	175
Anexo F - Ficha para coleta de dados	177
Anexo G - Questionário de Avaliação da saúde (do inglês, <i>Health Assessment Questionnaire</i>, HAQ).....	179
Anexo H - Parecer de aprovação no CEP do HCFMRP-USP para realização da pesquisa.....	180
Anexo I - Parecer de aprovação no CEP do HERP para realização da pesquisa	181

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune (DAI), inflamatória e de curso crônico (GABRIEL *et al.*, 1999). Tem distribuição mundial e ocorrência relativamente constantes (SILMAN AND PEARSON, 2002). A prevalência global de AR na população adulta é estimada em 0,5-1% nos países desenvolvidos, e em 0,1-0,5% nos países em desenvolvimento. No Brasil, é aferida uma prevalência de 0,5% para a doença (ALAMANOS AND DROSOS, 2005).

A manifestação clínica característica da AR é a inflamação da membrana sinovial, de pelo menos uma articulação, documentada por exame físico, ultrassonografia (US) e/ou ressonância nuclear magnética (RNM) (AMAYA-AMAYA *et al.*, 2013). Acredita-se que o início da AR ocorra em indivíduos com elevado risco genético para o seu desenvolvimento, combinado a aspectos epigenéticos que contribuem para hereditariedade e cronicidade da doença, e a ambientais que favorecem a formação de novos epítomos. Esses fatores desencadeariam uma cascata de eventos que induziriam sinovite e, enfim, artrite destrutiva (FIRESTEIN AND MCINNES, 2017).

1.1.1 Participação das respostas imune inata e adaptativa

O processo inflamatório visto na AR é sistêmico, o que é corroborado pela presença de anticorpos séricos e pela elevação das proteínas de fase aguda da inflamação (PAIs), tais como velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa (PCR), além de sintomas e sinais generalizados.

Essa inflamação crônica e a consequente hiperplasia sinovial (*pannus*), características da doença, são decorrentes de respostas imune inata e adquirida desorganizadas, integradas à ativação de redes de citocinas, condrócitos e transformações das células estromais tecido-residentes (FIRESTEIN, 2003; AREND AND FIRESTEIN, 2012), sendo complexa a interação entre células e mediadores solúveis imunes na sinóvia, especialmente quando considerado tempo de doença (MCINNES AND SCHETT, 2017).

Já foram identificadas na sinóvia reumatoide linhagens de células B em diferentes estágios de desenvolvimento, que são responsáveis pela produção de

anticorpos presentes na AR. A presença, no ambiente sinovial, de elementos como interleucina (IL)-6, *BLyS* (do inglês, *B-lymphocyte stimulator*), e *APRIL* (do inglês, *a proliferation-inducing ligand*), favorece a sobrevivência dessas células (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001; BOMBARDIERI *et al.*, 2011).

Cerca de dois terços de todos os casos de AR são representados pelas formas soropositivas, baseadas na presença de autoanticorpos específicos para autoantígenos modificados por citrulinização (anticorpos contra antígenos proteicos citrulinados, ACPAs) e/ou por autoanticorpos específicos para a fração Fc da imunoglobulina G (IgG), o fator reumatóide (FR) (MALMSTRÖM *et al.*, 2017). Este, apesar de ser o anticorpo clássico da doença, é inespecífico, podendo ocorrer em outras condições inflamatórias, particularmente as mediadas por células T (NEMAZEE, 1985; ROOSNEK AND LANZAVECCHIA, 1991)

Além de serem mais específicos que o FR para pacientes com AR, estando presentes em menos de 2% dos indivíduos saudáveis (MALMSTRÖM *et al.*, 2017), a detecção dos ACPAs permitiu avanços no entendimento da patogênese da doença (SCHELLEKENS *et al.*, 1998; GIRBAL-NEUHAUSER *et al.*, 1999). A descoberta experimental dos ACPAs foi introduzida à prática clínica pelo teste diagnóstico atualmente utilizado, qual seja, a detecção de anticorpo contra peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) (SCHELLEKENS *et al.*, 2000).

Modelos diferentes têm sido propostos para explicar a sequência de eventos que ocorrem na AR até o desenvolvimento de manifestações clínicas evidentes, acreditando-se que FR e anti-CCP atuem de maneiras distintas na etiopatogênese da doença soropositiva e que participem do início da resposta imune (FIRESTEIN AND MCINNES, 2017). Tem sido sugerido que a participação do FR na patogênese da AR ocorre de forma indireta (SMOLEN AND STEINER, 1998), pela capacidade de ativar a via do complemento e atuar como importante fator de atividade e cronicidade da doença (EZAKI *et al.*, 1996).

Já os anti-CCPs podem se ligar a proteínas próprias do indivíduo, tais como vimentina, α -enolase, colágeno, fibrinogênio, histonas e fibronectina (ANZILOTTI *et al.*, 2006), que foram modificadas por citrulinização. Este mecanismo é pós-translacional e ocorre devido à troca de peptidilarginina por peptidilcitrulina, mediada por ativação e ação da enzima peptidil-arginina-deiminase (PAD) (MAKRYGIANNAKIS *et al.*, 2006). Já os imunocomplexos (ICs), formados entre anti-

CCPs e autoantígenos citrulinados, também podem se ligar ao FR com consequente ativação da via do complemento (SABHARWAL *et al.*, 1982; ANQUETIL *et al.*, 2015), bem como aos osteoclastos (HARRE *et al.*, 2012). Suspeita-se que estes e seus precursores sejam as principais células a expressarem antígenos citrulinados na superfície celular, mesmo entre indivíduos em que o processo inflamatório ainda não tenha iniciado, sendo assim os primeiros tipos celulares alvos dos anti-CCPs (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2016; WIGERBLAD *et al.*, 2016).

A etiologia e o desenvolvimento das formas soronegativas da AR, por sua vez, são menos entendidos e muito provavelmente correspondem a subtipos mais heterogêneos que as variantes soropositivas (MALMSTRÖM *et al.*, 2017). As formas de AR com FR e anti-CCPs negativos podem ter seu mecanismo etiopatogênico explicado por outros modelos, tal como o proposto por Firestein *et al.*, em que a interação precoce entre ativação da resposta imune inata e fatores do estroma possam ser capazes de gerar alterações nas células estromais, incluindo modificações epigenéticas (FIRESTEIN AND MCINNES, 2017).

A membrana sinovial normal é relativamente hipocelular, composta por macrófagos espalhados em um estroma de sinoviócitos tipo fibroblastos (FLS, do inglês, *fibroblast-like synoviocytes*) e vasos sanguíneos esparsos. Numerosas vias de ativação de macrófagos têm sido descritas, incluindo receptores tipo-*Toll* (TLR, do inglês *toll-like receptor*), proteases solúveis, ICs e via interação cognata. Esses macrófagos, especialmente do fenótipo M1, liberam metaloproteinases, quimiocinas, citocinas e peptídeos vasoativos (FIRESTEIN AND MCINNES, 2017).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) que migram para a sinóvia na AR são inerentemente mais reativos a estímulos nocivos do que os PMNs de indivíduos saudáveis (BELLUCCI *et al.*, 2016). Além disso, apresentam níveis mais elevados de genes supra-regulados pela resposta ao interferon (IFN) (WRIGHT *et al.*, 2015) e de receptor de ativação de PMN, o TREM1 (do inglês *triggering receptor expressed by myeloid cells 1*), que, quando ativado, produz maiores concentrações de IL-8 e de outros agentes citotóxicos (CHEN *et al.*, 2015).

A participação ativa dos neutrófilos no processo inflamatório na AR é conhecida e é baseada na regulação exercida por eles na função de outras células imunes e estruturais (MANTOVANI *et al.*, 2011), tendo recentemente ganhado impulso com a descoberta da formação das *NETs* (*neutrophil extracellular traps*). Esta, por sua vez, compreende uma via alternativa de morte celular de neutrófilos,

em que há extrusão de fibras de cromatinas descondensadas contendo histonas e de outras proteínas citoplasmáticas para o meio extracelular, funcionando como armadilhas neutrofílicas (BRINKMANN *et al.*, 2004), e, conseqüentemente, como fontes de antígenos para modificação pós-translacional (WRIGHT *et al.*, 2014; THIEBLEMONT *et al.*, 2016). Além dos neutrófilos, mastócitos e eosinófilos, também são capazes de fornecer antígenos por descondensação de cromatina e deaminação de histonas (CORSIERO *et al.*, 2016).

Apesar de diversos tipos celulares contribuírem na etiopatogênese da AR, o linfócito T CD 4+ *helper* (Th) é considerado o direcionador da resposta imune na doença (SUZUKI *et al.*, 2003). Ele é funcionalmente dividido em células Th1, Th2, Th17, Th22 e regulatórias (Tregs), todas implicadas na patogênese da AR (DENG *et al.*, 2017). Mais recentemente, a Th9, uma nova célula T efetora que secreta IL-9, , foi identificada e pode estar envolvida na diferenciação de células B e produção de anticorpos (CICCIA *et al.*, 2015).

Antes da descoberta dos novos subtipos de linfócitos T, o desbalanço entre células Th1 e Th2 era considerado o paradigma na patogênese da AR, caracterizado pela marcante prevalência do fenótipo Th1, pela superprodução de IFN γ e pela inadequada produção de citocinas Th2, como IL-4 e IL-13 (BOISSIER *et al.*, 2012). A identificação de anormalidades quantitativas e qualitativas na população de Tregs de indivíduos com AR (MIYARA *et al.*, 2011) e a demonstração em modelos animais apontam que a resposta imune na doença pode ser controlada mantendo predomínio de Tregs (MIYARA *et al.*, 2014); tais indicadores têm sugerido que o desequilíbrio entre Tregs e Th17 possa ser o mecanismo principal para desenvolvimento e progressão da AR (BELLUCCI *et al.*, 2016).

Tanto os estímulos endógenos, como o TNF do líquido sinovial que aparece como principal fator de prejuízo de Tregs na AR (NIE *et al.*, 2013), quanto os exógenos, como o receptor de hidrocarboneto de arila (AhR) – que, a depender do seu ligante, induz diferenciação preferencial para Treg ou para Th17 (QUINTANA *et al.*, 2008; VELDHONEN *et al.*, 2008)–, podem atuar no desbalanço entre as Tregs e Th17 e promover o desenvolvimento de células Tregs e a inibição de Th17, e vice-versa (WING AND SAKAGUCHI, 2010).

As Tregs são comumente identificadas pela expressão de CD25, pela proteína-4 citotóxica de linfócito T (CTLA-4) e pelo fator de transcrição FoxP3. Além disso, têm a capacidade de manter a homeostase imune e suprimir a resposta pró-

inflamatória excessiva das células T contra o próprio indivíduo ou contra antígenos externos (VAN DEN BERG AND MCINNES, 2013). Isso acontece devido à produção de citocinas imunossupressoras como fator de transformação do crescimento (TGF)- β e IL-10 (SAKAGUCHI *et al.*, 2009), assim como à inibição da proliferação de células T efectoras (COBBOLD *et al.*, 2009), a expressão de CD80/CD86 nas APCs e ao bloqueio da co-estimulação pelo CTLA-4 (WING *et al.*, 2008).

A expansão das células Th17 e sua posterior ativação são permitidas pela IL-23. A principal citocina produzida pelas células Th17 é a IL-17A (BOISSIER *et al.*, 2012), e sua liberação pode ser estimulada pelo contato entre células imunes ativadas e sinoviócitos (NOACK *et al.*, 2016). A IL-17A estimula a produção de anticorpos pelas células B e induz fibroblastos a expressarem metaloproteinases, quimiocinas e outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF), IL-17F, IL-22 e IL-2. Além disso, há pouca produção de IFN γ pelo linfócito Th17 (BOISSIER *et al.*, 2012).

As citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos e outros tipos celulares participam de todas as fases da AR, contribuindo para a presença de autoimunidade, inflamação crônica e dano tecidual (MCINNES AND SCHETT, 2007), além de atuarem de forma redundante em uma rede de interação, regulando e favorecendo o microambiente inflamatório, bem como, favorecendo infiltração de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos na sinóvia, com posterior proliferação celular e mudança fenotípica nos FLSs (BOISSIER *et al.*, 2012). O perfil de citocinas é influenciado pelo estágio em que a doença se encontra (KLARESKOG *et al.*, 2006) e muitas delas, como ocorre com IL-6, TNF, IL-1, IL-17, atuam de forma combinada e com efeitos aditivos, sendo importantes alvos na terapia atual da AR (NOACK AND MIOSSEC, 2017).

A IL-6, na presença do seu receptor solúvel, está envolvida na proliferação dos sinoviócitos e da hiperplasia tecidual (MIHARA *et al.*, 1995), na regulação das células T e B e na diferenciação das células T *naive*, com favorecimento das células Th17 e inibição das Tregs (HUNTER AND JONES, 2015). Já a IL-17A estimula a produção de anticorpos por células B e induz fibroblastos a expressarem metaloproteinases, quimiocinas e outras citocinas pró-inflamatórias (BOISSIER *et al.*, 2012), contribuindo para cronicidade da doença (NOACK AND MIOSSEC, 2017) e para a degradação da cartilagem por ação de enzimas e

metaloproteinases, estimuladas por IL-6 (SUZUKI *et al.*, 2010), IL-1 (DAYER *et al.*, 1986) e IL-17 (MIOSSEC AND KOLLS, 2012; CHABAUD *et al.*, 2000).

A ação combinada de TNF e IL-17A aumenta a sobrevivência dos sinoviócitos e contribui para o fenótipo agressivo e invasivo do *pannus* (TOH *et al.*, 2010; HOT *et al.*, 2012). A sinergia entre TNF e IL-1 leva à indução da expressão de moléculas endoteliais de adesão ou do fator de estimulação de colônia de granulócitos-monócitos (GM-CSF) por células sinoviais (WICKS AND ROBERTS, 2016). A identificação de IFN tipo I, mediando a resposta imune no sangue periférico de indivíduos com anti-CCP e/ou FR positivo que apresentam artrite, independente da positividade de anti-CCP, favorece a participação dessa citocina na AR (VAN BAARSEN *et al.*, 2010) como biomarcador para desenvolvimento de artrite (LÜBBERS *et al.*, 2013) e potencial preditor de resposta terapêutica, como demonstrado para rituximabe (RATERMAN *et al.*, 2012) e para anti-TNF (MAVRAGANI *et al.*, 2010).

O dano ósseo visto na AR também tem como importante causa o desbalanço na via receptora do ligante do fator nuclear κ B (RANKL)/osteoprotegerina (OPG) (VIS *et al.*, 2013). O RANKL, expresso em osteócitos, osteoblastos, células sinoviais, células T ativadas e células B (BRAUN AND ZWERINA, 2011), liga-se ao receptor RANK presente em macrófagos, células dendríticas e pré-osteoclastos, favorecendo a osteoclastogênese (PETTIT *et al.*, 2001; REDLICH *et al.*, 2002). Já a formação de osteoblasto e a produção óssea são bloqueadas pela inibição da via *Wingless- β -catenin* pela esclerostina, uma proteína osteócito-específica (SEMĚNOV *et al.*, 2005).

A ação de IL-1 e IL-6 nos osteoblastos, em sinergia com sinoviócitos tipo-fibroblastos da AR (do inglês, *rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*, RASFs) (SHIGEYAMA *et al.*, 2000), estimulam a produção do RANKL (DAYER *et al.*, 1986; MIHARA *et al.*, 1995; HASHIZUME *et al.*, 2008), membro da família TNF. Assim, o TNF exerce papel importante no equilíbrio entre destruição e formação ósseas, ora atuando como potente direcionador na formação de osteoclastos (LAM *et al.*, 2000) – inibindo a diferenciação e a função de osteoblastos (BERTOLINI *et al.*, 1986) –, ora em sinergismo com IL-17, promovendo a diferenciação osteogênica de osteoblastos de células estromais mesenquimais humanas (OSTA *et al.*, 2014).

1.1.2 Etiopatogênese

Por ser patologicamente heterogênea (SMOLEN *et al.*, 2016) e ter respostas clínicas diferentes para terapias específicas, propõe-se que a AR não seja uma entidade única (FIRESTEIN AND MCINNES, 2017), sendo mais apropriado considerá-la como uma síndrome (FIRESTEIN, 2014) influenciada por fatores de risco individuais e externos (SMOLEN *et al.*, 2016; PAUL *et al.*, 2017).

Assim como fatores de risco genéticos influenciam o desenvolvimento e o risco para a doença, estudos recentes indicam que aspectos epigenéticos também estão sendo considerados nesses processos (KAMINSKY *et al.*, 2009). Quanto aos fatores de risco ambientais, estudos em modelos animais têm confirmado que eles podem iniciar DAIs e exacerbar manifestações da AR (MARRACK *et al.*, 2001), por quebrarem tolerância imune através de alterações pós-translacionais (COOPER *et al.*, 1999; MARRACK *et al.*, 2001).

1.1.2.1 Fatores de risco genéticos

Evidências suportam a influência da genética na patogênese da AR. A taxa de concordância da doença de 15% a 30% entre gêmeos monozigóticos é quatro vezes maior do que a taxa em gêmeos dizigóticos. Além disso, indivíduos com história familiar positiva para AR apresentam risco três a cinco vezes maior de desenvolver a doença (SILMAN AND PEARSON, 2002; FRISELI *et al.*, 2013). Cerca de 75% da variação fenotípica na doença pode ser explicada por elementos da história familiar, com a hereditariedade influenciando a produção de anticorpos de 40% a 65% na AR soropositiva (JIANG *et al.*, 2015; FRISELL *et al.*, 2016).

Os genes de suscetibilidade para AR podem ser classificados em genes pertencentes ao grupo HLA e genes fora desse grupo (não-HLA), sendo os do primeiro grupo mais fortemente associados à doença, tais como HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*13 e HLA-DRB1*15 (KURKÓ *et al.*, 2013). Com 9.154 alelos reportados (ROBINSON *et al.*, 2013), o sistema HLA representa o maior agrupamento de polimorfismos do genoma humano e o principal fator de risco genético para AR, responsável por cerca de 50% do risco genético para a doença (BARTON AND WORTHINGTON, 2009).

O sistema HLA em humanos está localizado no braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.3 (KLEIN AND SATO, 2000), em uma região conhecida por MHC. A associação de AR e genes HLA-DR é descrita desde 1969 (ASTORGA AND WILLIAMS, 1969). Estudos sorológicos posteriores mostraram a presença do sorotipo HLA-DR4 em 70% dos indivíduos de AR e cerca de 30% em indivíduos controles, e também que o gene *HLA-DRB1* possui subtipos diversos de alelos de risco para a doença (MCMICHAEL *et al.*, 1977; STASTNY, 1978).

Gregersen *et al* compararam as sequências de aminoácidos codificadas pelos alelos de risco do *HLA- DRB1* e demonstraram uma sequência comum de aminoácidos nos resíduos 70-74, na terceira região hipervariável da cadeia β da molécula DR1 onde ocorre a ligação do antígeno. Essa sequência de suscetibilidade para AR, geralmente representada por glutamina-leucina-arginina-alanina-alana (QKRAA), é conhecida por epítipo compartilhado (SE, do inglês *shared epitope*) e está presente em algumas moléculas DR4 e DR14 (GREGERSEN *et al.*, 1987).

Estudos de associação genética em AR foram impulsionados pela descoberta dos anti-CCPs. O risco relativo de desenvolver AR é de aproximadamente 5:1 em indivíduos carreadores dos alelos HLA-DR4 (FIRESTEIN AND MCINNES, 2017), com alguns genótipos HLA associando-se à doença mais agressiva e de maior mortalidade (VIATTE *et al.*, 2015). Louzada-Júnior *et al* observaram frequência mais elevada na positividade de anti-CCP em indivíduos com AR carreadores dos alelos do SE quando comparado a indivíduos não-carreadores (LOUZADA-JÚNIOR *et al.*, 2008). Dados de outra coorte identificaram que há maior participação do HLA de classe I na AR com anti-CCP negativo, enquanto o HLA de classe II está predominantemente associado à AR com anti-CCP positivo (BOSSINI-CASTILLO *et al.*, 2015).

Entre os alelos de risco para AR, HLA-DRB1*0401, *0404, *0101 e *1402 são os mais associados à doença, estando pelo menos um deles presente em 90% dos pacientes (WEYAND *et al.*, 1992). Já os alelos HLA de risco para AR variam em frequência de acordo com a população: HLA-DRB1*04:01, *04:04 e *04:08 em caucasianos; HLA-DRB1*04:05 em espanhóis e japoneses; HLA-DRB1*01:01 e *01:02 em israelenses; HLA-DRB1*14:02 em alguns povos nativos da América do Norte; e HLA-DRB1*10:01 em gregos (NEWTON *et al.*, 2004).

No Brasil, em estudo com indivíduos saudáveis, foi observada a presença de todos os alelos do HLA-DRB1 do SE, sendo o polimorfismo dos alelos do

DRB1*04 maior em indivíduos caucasianos do que em afro-descendentes (LOUZADA-JÚNIOR *et al.*, 2001). Quando avaliadas populações de AR latino-americanas, os alelos de risco HLA-DRB1*01:01, *04:01, *04:04 e *04:05 estavam presentes (LOUZADA-JÚNIOR *et al.*, 2008; Cruz-Tapias *et al.*, 2012), sendo identificada uma menor frequência dos alelos *0103, *0402, *1102, *1103, *1301 e *1302, com consequente redução na suscetibilidade para AR (LOUZADA-JÚNIOR *et al.*, 2008).

Os mecanismos pelos quais alelos HLA-DRB1 do SE atuam na AR ainda não estão totalmente esclarecidos (CHUNG *et al.*, 2016). Resíduos de aminoácidos localizados na posição 11 – também na fenda de ligação com peptídeos –, especialmente variantes da leucina ou valina, foram identificados como provável influência na seleção do antígeno (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2012).

Apesar das evidências consistentes de participação do HLA-DR na etiopatogenia da AR, é crescente a descrição também de genes não-HLA nesse processo. Quanto à influência desses genes na AR, dados recentes de metanálise de estudos de associação pangenômico (GWAS, *genome-wide association study*) identificaram mais de 100 *loci* associados ao risco para a doença e sua progressão. Desses genes, 26% foram definidos como candidatos a genes de risco para AR e implicados em mecanismos imunes ou regulatórios, podendo vir a ser alvos potenciais para terapias na doença (OKADA *et al.*, 2014).

Entre os genes não-HLA, as variantes do gene da *PTPN22* mostram as associações mais robustas com AR (BEGOVICH *et al.*, 2004), sendo o polimorfismo rs2476601 (variante 1858C/T) o segundo fator genético mais importante, com taxa de risco para AR de cerca de 8% (LEE *et al.*, 2007). Esta variante, por sua vez, é responsável pela substituição da arginina pelo triptofano, ocasionando impacto indireto na ativação de células T mediada por efeitos polimórficos em macrófagos (LI *et al.*, 2017); ademais, está associada à produção de anti-CCP, visto como melhor preditor de risco de AR do que alelos do SE (JOHANSSON *et al.*, 2006).

Além do polimorfismo do gene da *PTPN22*, recentes metanálises têm mostrado uma associação entre AR e outros polimorfismos genéticos. Como exemplos, temos o que ocorre com os genes da *PADI4* e do *CTLA-4* (SUZUKI *et al.*, 2013), o do sinal transdutor e ativador de transcrição 4 (*STAT4*, do inglês, *signal transducer and activator of transcription 4*) (ELSHAZLI AND SETTIN, 2015), o do receptor de quimiocina do tipo 6 (*CCR6*, do inglês, *chemokine receptor 6*) (CHENG

et al., 2015), o da *IL4* (PARK *et al.*, 2017), o do receptor da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*, do inglês, *methylenetetrahydrofolate reductase receptor*) (YUAN *et al.*, 2017) e o da proteína 3 induzida pelo TNF- α (*TNFAIP3*, do inglês, *tumor necrosis factor alpha inducible protein 3*) (SHEN *et al.*, 2017).

1.1.2.2 Fatores de risco ambientais

Quando comparados a pesquisas genéticas, os estudos que avaliam a participação de fatores de risco ambiental na AR ainda são quantitativamente limitados (MILLER *et al.*, 2012). Tem sido sugerido, porém, que agentes ambientais possam contribuir em até 70% para a perda de tolerância imune (VOJDANI *et al.*, 2014; POLLARD, 2015), e que, provavelmente, eles precisem ocorrer em diferentes períodos da vida ou em certa sequência temporal para que possam influenciar na resposta imune (MILLER, 2011).

Entre os fatores ambientais de risco, tabagismo e exposição à sílica são os que têm maior número de evidências quanto à associação com AR, mas apenas com o tabagismo há a evidência de interação genética (GOULIELMOs *et al.*, 2016). Esta, apesar de ainda não ser completamente entendida, é específica para pacientes com anti-CCP positivo (MALMSTRÖM *et al.*, 2017), como também demonstrado por Oliveira *et al.* – ao identificarem uma maior frequência na positividade de anti-CCP somente em pacientes com AR carreadores de SE tabagistas (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O maior risco para AR com anti-CCP positivo também foi descrito em indivíduos do sexo masculino expostos à sílica, sendo de 60% a proporção atribuível a essa interação. Esse risco ainda é cerca de sete vezes maior em tabagistas, quando comparado a não-tabagistas (STOLT *et al.*, 2010). Foi demonstrado que mulheres com exposição prévia ao pó derivado de produtos têxteis apresentam maior risco de desenvolver AR, seja com anti-CCP positivo ou negativo, e aquelas carreadoras do SE têm maior risco para positividade de anti-CCP (TOO *et al.*, 2016).

Outros fatores de risco ambientais, como infecção e dieta, aparecem como potenciais candidatos. Agentes infecciosos têm sido propostos como gatilhos para início e propagação da resposta imune na AR. Os mecanismos predominantes para que isso ocorra variam entre os agentes, podendo ser através de mimetismo

molecular, de dispersão de epítomos ou de persistência do patógeno na sinóvia (FUJINAMI *et al.*, 2006; ANAYA, 2012).

A infecção por *Porphyromonas gingivalis*, bactéria bastante comum na doença periodontal crônica, tem sido implicada na AR e parece preceder o seu desenvolvimento, como visto em modelos animais em que a artrite foi mais grave naqueles com periodontite pré-existente (CANTLEY *et al.*, 2011). Entre outros possíveis agentes infecciosos envolvidos na AR, é possível que a *Proteus mirabilis*, o *Escherichia coli*, o Parvovírus B1 e o vírus Epstein-Barr (EBV) estejam envolvidos no início da doença (EBRINGER AND WILSON, 2000).

A possibilidade de que a dieta atue na etiopatogênese da doença como modificador de risco para o seu desenvolvimento já havia sido considerada previamente (PEDERSEN *et al.*, 2005). Nesse sentido, Tedeschi *et al* mostraram recentemente que 24% de pacientes de AR relataram que certos alimentos afetam os sintomas, ocorrendo piora em 19% dos indivíduos (TEDESCHI, FRITs, *et al.*, 2017). Ademais, restou demonstrado que certos alimentos poderiam estar associados à menor atividade da doença (TEDESCHI, BATHON, *et al.*, 2017).

A influência da dieta e de seus metabólitos na etiopatogênese da AR ganha força com evidências que trazem a epigenética participando também desse processo, já que metabólitos provenientes da dieta poderiam favorecer mudanças epigenéticas, sendo uma explicação possível para baixas taxas de coincidência entre gêmeos nas DAIs, na AR de 3-5% em dizigóticos e de 12-15% em monozigóticos (BALLESTAR, 2010).

1.1.2.3 Fatores de risco epigenéticos

A epigenética é definida como um fenótipo estável, hereditário, resultante de modificações no cromossomo, sem que haja alterações no sequenciamento do DNA (BERGER, S. L. *et al.*, 2009). As alterações epigenéticas são capazes de determinar a estrutura específica da cromatina e, conseqüentemente, a função do gene (GOLBABAPOUR *et al.*, 2011), interferindo na inflamação crônica ao modular a expressão de citocinas, incluindo as TNF, IL-6 e IL-1, induzindo fator de transcrição NF- κ B (CIECHOMSKA AND O'REILLY, 2016).

Os mecanismos epigenéticos compreendem uma modificação pós-

translacional de histonas, metilação de DNA e espécies de RNA não codificados, sendo eles os microRNAs (miRNAs) e os RNA não codificados longos (lncRNA) (AHMADI *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que a metilação única no dinucleotídeo CpG da região promotora do gene da CTLA-4 nas células Tregs de pacientes com AR resultou na ligação prejudicada do fator nuclear de células T ativadas. Em decorrência dessa desregulação da CTLA-4, as Tregs foram incapazes de ativar a enzima indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO1) que degrada o triptofano (Trp) – o que, consequentemente, prejudicou a via imunomoduladora das quinureninas (Kyns) (CRIBBS *et al.*, 2014).

A hipometilação do DNA global foi observada em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos com AR (LIU *et al.*, 2011), assim como em níveis reduzidos de metilação na região promotora de IL-6 dessas células, quando comparado a controles (ISHIDA *et al.*, 2012), e na de quimiocina CXCL12, o que afetou a expressão de metaloproteinases (KAROOUZAKIS *et al.*, 2011). A região promotora da IL-10, uma citocina com ação antiinflamatória, é hipermetilada em diferentes ilhas de CpG, e a demetilação dessa região tem surgido como opção de intervenção terapêutica na AR (FU *et al.*, 2011).

1.1.3 Evolução clínica e seguimento

Como consequência da interação entre genética, epigenética e exposição ambiental, havendo ou não alteração pós-translacional de autoantígenos, a perda de tolerância acontece e uma fase pré-clínica da AR se inicia, antes mesmo que alterações sinoviais e sistêmicas sejam perceptíveis por sinais e sintomas clínicos (KRAAN *et al.*, 1998; HAYER *et al.*, 2007). A transição das fases iniciais para sinovite crônica estabelecida parece ocorrer muito cedo na AR (KRAAN *et al.*, 1998; HAYER *et al.*, 2007).

A doença pode apresentar-se em diferentes fases dentro de um espectro evolutivo, que vai desde um estado de risco pré-clínico até a AR estabelecida (Figura 1) e podem ser acompanhadas de sintomas inespecíficos, como fadiga, astenia e hiporexia (AMAYA-AMAYA *et al.*, 2013). A produção de anticorpos pode ocorrer em uma fase pré-clínica, sendo possível detectar anti-CCPs até dez anos antes do diagnóstico clínico (NIELEN *et al.*, 2004). Em cerca de 15% dos casos, os

pacientes apresentarão manifestações extraarticulares (TURESSON *et al.*, 2002), como vasculite, alterações oculares e manifestações neurológicas e pulmonares.

Figura 1 – Fases da AR

Fonte: Paul *et al.* (2017, adaptado)

Diante da necessidade de identificar a AR em estágios iniciais, e corroborada pela descoberta dos anti-CCPs, em 2010 foram elaborados novos critérios de classificação para a doença, propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR, do inglês *American College of Rheumatology*) e pela Liga Européia Contra o Reumatismo (EULAR, do inglês *European League Against Rheumatism* (ALETAHA *et al.*, 2010) (Anexo A).

Antes do surgimento dos critérios ACR/EULAR-2010, os critérios mais usados para classificação de AR eram os do ACR-1987, que, devido à coorte em que foram desenvolvidas, eram melhores na identificação de indivíduos com mais tempo de doença (Tabela 2) (ARNETT *et al.*, 1988). Ambos os critérios de classificação buscam padronizar a inclusão de pacientes nos estudos populacionais de AR, e podem ser utilizados como ferramenta de suporte para o diagnóstico (Anexo B) (SMOLEN *et al.*, 2016).

O grau de atividade inflamatória deve ser determinada sempre que possível, tanto na avaliação inicial como nas subsequentes, através de medidas diretas – tais como, quantificação de articulações dolorosas (AD) e edemaciadas (AE) (PINCUS AND SOKKA, 2009), PAIs, detecção de artrite e/ou tenossinovite por US (D'AGOSTINO AND BREBAN, 2002) –, e indiretas, como escala visual analógica

(EVA) para dor e avaliação global (AG) da saúde do paciente, incapacidade (WELLS, 2009), fadiga e depressão (SCOTT *et al.*, 2010).

Para padronização e quantificação desse grau de atividade inflamatória na prática clínica, têm sido recomendados os índices compostos de atividade da doença (ICADs) (WELSING *et al.*, 2001), que, por sua vez, aparecem como ferramentas capazes de unificar parâmetros preditores de processo inflamatório ativo. Dentre os ICADs, o DAS-28 (*Disease Activity Score- 28 joints*) (PREVOO *et al.*, 1995), o SDAI (*Simplified Disease Activity Index*) (SMOLEN *et al.*, 2003) e o CDAI (*Clinical Disease Activity Index*) (ALETAHA AND SMOLEN, 2005) mostraram boa acurácia em determinar atividade da doença e sensibilidade a mudanças com a terapia, além de serem fáceis de usar e de possuírem critérios de remissão (tabela 1.1) (PINCUS AND SOKKA, 2003).

Tabela 1.1 - Índices compostos de atividade da doença e critérios de remissão pelo ACR/ EULAR

ICADS	Equações e componentes	Remissão	Pontos de corte		
			Baixa atividade	Moderada atividade	Alta atividade
DAS-28 VHS	$0,56 \times \sqrt{n^{\circ} \text{AD}(28)} + 0,28 \times \sqrt{n^{\circ} \text{AE}(28)} + 0,70 \times \text{Ln}(\text{VHS}) + 0,014 \times \text{EVA}$	< 2.6	2.6 a 3.2	>3.2 a ≤5.1	>5.1
DAS-28 PCR	$0,56 \times \sqrt{n^{\circ} \text{AD}(28)} + 0,28 \times \sqrt{n^{\circ} \text{AE}(28)} + 0,36 \times \text{Ln}(\text{PCR, mg/l,} +1) + 0,014 \times \text{EVA} + 0,96$	< 2.6	2.6 a 3.2	>3.2 a ≤5.1	>5.1
SDAI	AD(28) + AE(28) + AG paciente + AG médico + PCR (mg/dl)	≤ 3.3	>3.3 a 11	>11 a ≤ 26	> 26
CDAI	AD(28) + AE(28) + AG paciente + AG médico	≤ 2.8	>2.8 a 10	>10 a ≤ 26	> 22

DAS-28, do *inglês disease activity score*, escore de atividade da doença baseado na contagem de 28 articulações.

SDAI, do *inglês simple disease activity index*, índice simplificado de atividade da doença.

CDAI, do *inglês clinical disease activity index*, índice clínico de atividade da doença.

AD (28): número de articulações dolorosas dentre 28 possíveis; AE (28): número de articulações edemaciadas dentre 28 possíveis; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C reativa; EVA: escala visual analógica; AG: avaliação global

Fonte: Smolen *et al* (2016, Adaptado)

O uso de medicamento modificador do curso da doença (MMCD) é o pilar da terapia de AR em pacientes com doença em atividade inflamatória. Eles têm a

capacidade de aliviar sinais e sintomas, melhorar funcionalidade e inibir danos estruturais ósseo e cartilaginoso (SMOLEN *et al.*, 2017).

Os MMCDs são divididos em sintéticos, tendo o metotrexato (MTX) como principal droga, e em biológicos, como bloqueadores do TNF- α , modulador da co-estimulação da célula T (abatacepte), agentes anti-célula B (rituximabe) e o anticorpo monoclonal contra receptor da IL-6 (tocilizumabe) (SMOLEN *et al.*, 2014). Entre os MMCDs, o MTX deve fazer parte da primeira linha de tratamento, desde que não haja contraindicações, dada a sua segurança a longo-prazo e à eficácia (GOODMAN *et al.*, 2015). Pode ser utilizado em monoterapia ou combinado a corticóides e/ou outros MMCDs, sintéticos ou biológicos.

A meta do tratamento é atingir remissão ou baixa atividade da doença após seis meses, ou mudança para um melhor estado de atividade da doença, com pelo menos redução de 50% do valor do ICAD utilizado após três meses do início da terapia. Quando a remissão ou a baixa atividade da doença não é atingida com o MMCD escolhido, e mantidas moderada a alta atividade da doença, a estratégia de tratamento deve ser modificada em busca do "*treat-to-target*" (SMOLEN *et al.*, 2017). No Brasil, uma diretriz para tratamento da AR foi proposta para a realidade local (Figura 2).

A avaliação da resposta terapêutica deve basear-se em uma visão holística do indivíduo com AR, considerados aspectos como manifestações extrarticulares, grau de funcionalidade, progressão radiológica e presença de comorbidades, especialmente doenças cardiovasculares, depressão e ansiedade. O grau de funcionalidade na AR pode ser determinada pelo questionário de avaliação de saúde funcional (do inglês, *Health Assessment Questionnaire*, HAQ) (Anexo G), que tem se mostrado um bom preditor de mortalidade e de incapacidade (BRUCE AND FRIES, 2005).

Figura 2 - Algoritmo de tratamento para AR

csMMCD: medicação modificadora do curso da doença sintética convencional; bMMCD; medicação modificadora do curso da doença biológica; * preferencialmente incluir MTX; ** no caso de toxicidade à droga, ausência de resposta clínica em três meses depois de iniciado o tratamento ou não ter atingido o objetivo da terapia após seis meses de tratamento; # preferencialmente; ** alternativa; & anti-TNF ou abatacepte ou tocilizumabe; && outro anti-TNF ou abatacepte ou tocilizumabe ou rituximabe.

Fonte: Da Mota *et al.* (2018, adaptado).

1.2 Vias de metabolização do triptofano

O L-triptofano (L-Trp) é um grande aminoácido neutro presente nos organismos vivos, sendo um dos vinte aminoácidos (AAs) incorporados a proteínas durante o processo de translação do RNA mensageiro (mRNA) (PALEGO *et al.*, 2016), e um dos nove AAs essenciais para humanos. não pode ser sintetizado de forma endógena, mas pode ser obtido através de alimentos, conforme demonstrado em estudos com manipulação de dieta (ROSE, 1968).

A frequência de resíduos de L-Trp nas proteínas é em média de 1-2% e, juntamente com a cistina, é o AA essencial requerido em menor quantidade na dieta (CONSULTATION, 2007). A presença do anel indol na estrutura química do L-Trp é

responsável por sua propriedade hidrofóbica, diferenciando-a dos demais AAs (figura 3) (PALEGO *et al.*, 2016).

Figura 3 -. Triptofano. Em destaque o anel indol

Fonte: Palego et al.(2016)

A absorção do L-Trp ocorre em todos os tecidos e células de acordo com a necessidade de síntese protéica e degradação, sendo intestino, fígado e músculos os envolvidos primariamente nessa modulação. A participação do microbioma intestinal é também um importante aspecto, o que tem fortalecido a interação entre nutrição, absorção intestinal, destino do L-Trp e saúde (PALEGO *et al.*, 2016).

O Trp é metabolizado em quatro vias, sendo a principal a das Kyns, responsável por mais de 90% do metabolismo do L-Trp (LE FLOC'H *et al.*, 2011). As outras três vias são quantitativamente de menor significância: a hidroxilação, com a produção de 5-HT e de melatonina; a descarboxilação, que produz a triptamina; e a transaminação, que tem como produto o ácido indolepirúvico (BADAWY, 2017a) (Figura 4). Fatores endógenos, como insulina, cortisol e glucagon, e individuais, como idade, sexo e atividade física, concorrem para regular a renovação proteica e as concentrações do Trp no plasma (SIMMONS *et al.*, 1984; CYNOBER, 2002).

Figura 4 - Via das quinureninas e metabolismo do L-triptofano

Fonte: Yeung *et al.*, (2015, adaptado)

Além de participar do *turnover* e da síntese de peptídeos, o Trp tem sido alvo de estudos, pois sua transformação em uma variedade de pequenos compostos pleotrópicos e bioativos e sua posterior absorção são capazes de influenciar vias metabólicas celulares e respostas fisiológicas. Apesar do Trp produzir metabólitos importantes e participar de uma variedade de reações enzimáticas essenciais no corpo, apenas uma certa quantidade deste AA em humanos parece ser necessária à saúde, não sendo tão importante seu acúmulo nos tecidos (PALEGO *et al.*, 2016).

A via das Kyns é a principal via de metabolização do Trp, ocorrendo principalmente no fígado e gerando compostos que podem ser biologicamente ativos ou citoprotetores, como o ácido quinurênico, ou citotóxicos, e o ácido quinolínico, que atua como agonista do receptor N- metil-D- aspartato (NMDA) (PERKINS AND STONE, 1983; SCHWARCZ *et al.*, 2012).

A degradação extrahepática do Trp pela via das Kyns é mínima (5-10%), ocorrendo especialmente em macrófagos, monócitos e células dendríticas (DCs), tornando-se quantitativamente significativa sob condições de ativação imune (BADAWY, 2015) devido à ativação da IDO1 pelo IFN- γ (MELLOR AND MUNN, 1999). Apenas cerca de 1 a 5% do L-Trp é desviado para a via *methoxyindole*, para

conversão em serotonina (5-hydroxytryptamine, 5-HT) e melatonina (OXENKRUG, 2010). Essa pequena quantidade de Trp da dieta e/ou endógena convertida em 5-HT sugere que a biodisponibilidade desse AA e/ou alterações na regulação do seu metabolismo tissular são críticos para manter um balanço saudável entre suas diferentes vias e seus destinos (BENDER, 1983).

A biossíntese de 5-HT a partir do Trp ocorre em duas etapas enzimáticas. Na primeira, o Trp é hidroxilado por hidroxilase-Trp (TPH) para produzir 5-hidroxitriptofano (5-HTP); na segunda, o recém-formado 5-HTP é descarboxilado pela descarboxilase-aminoácido-aromático (AADC), produzindo 5-HT (WALTHER AND BADER, 2003). A TPH1 é responsável pela produção de 5-HT no trato gastrointestinal (TGI) e a TPH2 no sistema nervoso central (SNC) (BLIZIOTES, 2010). O aumento das concentrações de Trp pode, pelo menos teoricamente, elevar a produção de 5-HT por essa via metabólica (BERGER, M. *et al.*, 2009).

Cerca de 95% da 5-HT é encontrada fora do SNC, na periferia. Produzida pelas células enterocromafins do intestino (GERSHON AND TACK, 2007; MAWE AND HOFFMAN, 2013), eventualmente ela entra na circulação sanguínea, onde é capturada por plaquetas e liberada por estas quando ativadas (CÔTÉ *et al.*, 2004). Apenas de 5% a 15% permanecem livres no plasma (ERNBERG *et al.*, 2000) (CHAUVEAU *et al.*, 1991).

1.3 A enzima IDO1

Até 2007, acreditava-se que o catabolismo do Trp pela via das Kyns era realizado apenas pelas enzimas indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO). A partir de então, um novo gene da IDO foi descrito, o da IDO2 (MURRAY, 2007), e assim passou-se a considerar o envolvimento das três enzimas, IDO1, TDO e IDO2, no catabolismo do Trp (FATOKUN *et al.*, 2013).

A IDO1 é composta por 403 AA, está localizada no citosol, sem forma extracelular conhecida (Figura 5). Dentre as três enzimas citadas, a IDO1 é a que melhor caracteriza a ação enzimática na metabolização do Trp pela via das Kyns (VACCHELLI *et al.*, 2014), e a que tem maior afinidade pelo Trp, sendo sua atividade inibida por altas concentrações desse AA (BADAWY, 2017b). Além da metabolização do Trp, a IDO1 também reconhece e desestabiliza os anéis Índole da

5-HT, da melatonina e da triptamina (PALEGO *et al.*, 2016).

Figura 5 - Estrutura da molécula humana da enzima IDO1

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/?term=IDO1>

Entre as células do sistema imune que podem participar da modulação da resposta imune pela indução da IDO1, estão células Tregs (SHEVACH, 2002; NIEDERKORN, 2008), macrófagos (SICA AND BRONTE, 2007), mastócitos (LU *et al.*, 2006) e DCs (RUTELLA *et al.*, 2006). As DCs que expressam IDO1 são consideradas DCs regulatórias especializadas por causarem tolerância através do seu efeito regulatório nas células T (MUNN *et al.*, 2002).

Além disso, a enzima atua na modulação de função de células endoteliais, na vasodilatação, no recrutamento de PMNs para locais de inflamação, na produção de anticorpos (WANG *et al.*, 2010), na indução de apoptose de células Th1 (FALLARINO *et al.*, 2002), no bloqueio da diferenciação de células CD4⁺ em Th17 (SUNDRUD *et al.*, 2009) e na tolerância periférica de subtipos de DCs (MUNN *et al.*, 2002).

Os IFN- α , IFN- β e IFN- γ têm participação na expressão de IDO1 em células mononucleares de sangue periférico (CARLIN *et al.*, 1987). O IFN- γ é o principal indutor dessa expressão em vários tipos celulares (PFEFFERKORN *et al.*, 1986), enviando sinais para a regulação das fases transcricional e pós-translacional (BRAUN *et al.*, 2005). A atividade da IDO1 também é avaliada de forma indireta pela relação Kyn por Trp (KTR), e esta parece ser um indicador sensível da degradação de Trp induzida por IFN- γ e da ativação do sistema imune (FUCHS *et al.*, 1990; GASSE *et al.*, 1994).

Citocinas antiinflamatórias, tais como IL-4, TGF- β e IL-10, inibem a indução da IDO1 pelo IFN- γ , enquanto IL-1, TNF- α e IL-2 potencializam sua ativação, sendo a atuação de IL-2 via IFN- γ (BADAWY, 2013). A participação de IL-6 e TGF- β na regulação e nas funções da IDO1 por mecanismos independentes da degradação de Trp também é descrita (PALLOTTA *et al.*, 2011).

A IDO1 é uma enzima codificada por um gene de cópia simples, conhecido por gene IDO1 ou IDO, composto de dez exons, localizado no braço curto do cromossomo 8, na posição 8p12-p11 (BURKIN *et al.*, 1993) (Figura 6); ademais, pode ter sua expressão influenciada por fatores extrínsecos e pela própria variabilidade genética. A promoção da transcrição e metilação do DNA é estimulada pela ação do IFN γ (XUE *et al.*, 2012) e inibida pela deacetilação de histona (REDDY *et al.*, 2008).

Figura 6 - representação esquemática do gene que codifica a IDO1

Fonte: adaptado

Apesar de ser codificada por um gene evolutivamente antigo, que antecede o sistema imune adaptativo, a IDO1 tem adquirido papel relevante na homeostase imune (MELLOR AND MUNN, 2004). Entre as variações genéticas da IDO1 em humanos, têm sido descritos o polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) e a deleção de pares de bases, alguns deles relacionados ao aumento ou à redução da expressão proteica da IDO1 (AREFAYENE *et al.*, 2009; TARDITO *et al.*, 2013).

Arefayene *et al* avaliaram 96 indivíduos saudáveis, entre afrodescendentes e caucasianos, e identificaram 17 alelos, sendo a variante Ala⁴Thr (+10 G > A) no exon 3 e a deleção 9bp no exon 7, ambos associados à função

reduzida da enzima (AREFAYENE *et al.*, 2009). Outro estudo identificou que sequências polimórficas repetidas *in tandem* na região promotora do gene da IDO1 associaram-se a níveis reduzidos de Trp no sangue de caucasianas saudáveis (SOICHOT *et al.*, 2011).

Outros estudos têm buscado associações genéticas do polimorfismo genético da IDO1 nas DAIs. Lee *et al* identificaram na doença de Chrön que indivíduos carreadores de determinados alelos apresentavam fenótipo mais grave, com manifestações extra-intestinais como artrite e uveíte, e menor relação Kyn/L-Trp (LEE *et al.*, 2014). Já na esclerose sistêmica, a presença da variante alélica T do SNP rs7820268 foi associada a um possível prejuízo na atividade supressora da Treg CD8+ (TARDITO *et al.*, 2013).

1.4 Participação dos metabólitos do Trp na resposta imune

Em 1998, Munn e colegas demonstraram pela primeira vez que a IDO1 exerce funções mais imunossupressoras que imunoestimulatórias, ao impedir a rejeição de fetos iniciada pela células T do sistema imune materno (MUNN *et al.*, 1998). De acordo com modelos atuais, a IDO1 limitaria a resposta imune inata e adaptativa por dois mecanismos, não mutuamente exclusivos: depleção de Trp nas células efectoras (MUNN *et al.*, 1999; UYTENHOVE *et al.*, 2003) e promoção de acúmulo de Kyn e derivados (FALLARINO *et al.*, 2003).

Esses mecanismos podem ser avaliados pela atividade da IDO1, através da relação Kyn/Trp, estando esta relacionada positivamente a níveis séricos de biomarcadores inflamatórios (SCHEFOLD *et al.*, 2009). A indução da IDO1, seja *in vitro* ou *in vivo*, causa uma rápida depleção de Trp intracelular e uma liberação dos seus metabólitos no meio extracelular e no microambiente (TAYLOR AND FENG, 1991; AUNE AND POGUE, 1989).

In vitro, a supressão da célula T, mediada pela IDO1, é dependente da redução dos níveis de Trp e da presença de Kyns (MUNN AND MELLOR, 2013). Além disso, a citotoxicidade das Kyns afeta preferencialmente células T ativadas e se intensifica ao longo da exposição (FALLARINO *et al.*, 2002), bem como, suprime a atividade inflamatória das células Th17 (Favre *et al.*, 2010) e pode também afetar linfócitos B e células T natural killer (NK), mesmo em pequenas concentrações *in vivo* (TERNESS *et al.*, 2002). A IDO1 contribui também para a regulação de

diferenciação e função das Tregs. *In vitro*, a privação de Trp atua sinergicamente com Kyns na diferenciação de células T CD4⁺ em Tregs (FALLARINO *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2008; MANCHES *et al.*, 2008).

In vivo, inibidores da IDO1 – ou ablação genética de genes da IDO1 – preveniram a diferenciação normal de Tregs antígeno-específico em mucosa (MATTEOLI *et al.*, 2010), e Tregs em cultura mostraram aumento na função supressora ao serem ativadas por DCs expressando IDO1 (SHARMA *et al.*, 2007). A produção de Kyns é influenciada pelas Tregs através da expressão de CTLA-4, um indutor de IDO1 (PUCCETTI AND GROHMANN, 2007).

Tem sido demonstrado que a expressão de AhR na AR é importante para a patogênese da doença por induzir a produção de citocinas inflamatórias em FLSs, por influenciar o metabolismo ósseo via modulação do equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos e, também, por regular a geração de Th17 (NGUYEN *et al.*, 2015). Em resposta à ativação por um ligante, o AhR se transloca do citoplasma para o núcleo da célula, onde controla a transcrição de uma variedade de genes alvos (GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ AND QUINTANA, 2018). Os metabólitos do Trp também atuam como ligantes no AhR, sugerindo que o efeito das Kyns nesse receptor seja imunossupressor (OPITZ *et al.*, 2011), ocasionando um fenótipo tolerogênico (WILLIAMS, 2013).

A depleção aguda de Trp tem sido associada a humor deprimido, ansiedade, e fadiga (DELGADO *et al.*, 1990); o aumento na atividade da IDO1, por sua vez, leva ao desbalanço nas vias Kyn/5-HT, contribuindo para a redução da síntese de 5-HT e para o acúmulo dos metabólitos das Kyns com propriedades neuroativas (LAPIN AND OXENKRUG, 1969).

A 5-HT é um importante neurotransmissor e seus principais locais de produção são o SNC, as plaquetas e o TGI. Além disso, a função desempenhada pela 5-HT é dependente do local em que foi produzida (BERGER, M. *et al.*, 2009). A interação de 5-HT com seus receptores (5-HTRs) regula vários aspectos da cognição, do comportamento, de vários ritmos neuroendócrinos e de fisiologia, como sono, humor, balanço energético, regeneração tissular, coagulação, funções do TGI e imunidade (BAGANZ AND BLAKELY, 2013; LESCH AND GUTKNECHT, 2005; MENESES, 1999) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Distribuição e expressão de receptores de serotonina (5-HT) (5-HTRs) em células imunes de humanos e de murinos

Família	Distribuição	Subtipo	Tipo de célula que expressa o receptor
5-HTR1	SNC e SCV	A	mastócitos, monócitos, macrófagos, NKs, DCs, células T e B
		B	DCs e células T
		E	monócitos, DCs
		D e F	desconhecido
5-HTR2	SNC, SNP, TGI, SCV, plaquetas	A	eosinófilos, monócitos, macrófagos, DCs, células T e B
		B	monócitos, macrófagos, DCs
		C	macrófagos
5-HTR3	SNC, SNP, TGI,		monócitos, DCs, células T e B
5-HTR4	SNC, SNP, TGI, SCV		monócitos, macrófagos, DCs
5-HTR5			
5-HTR6	SNC		desconhecido
5-HTR7	SNC, SNP, TGI, SCV		neutrófilos, monócitos, macrófagos, DCs, células T e B

Adaptado de () () (

sistema nervoso central (SNC); sistema cardiovascular (SCV); sistema nervoso periférico (SNP); NKs, do inglês *natural killer cells*; DCs, do inglês *dendritic cells*, células dendríticas; TGI: trato gastrointestinal;

Fonte: Ahern (2011); Baganz and Blakely (2013); Fidalgo *et al.* (2013) (Adaptados)

As propriedades quimiotáticas da 5-HT em humanos são mediadas nos mastócitos pelo 5-HTR1A, nos eosinófilos pelo 5-HTR2A e nas DCs de murinos pelas vias de 5-HTR1 e 5-HTR2, atuando direta ou indiretamente para o recrutamento de neutrófilos, DCs, mastócitos e eosinófilos na inflamação aguda (BOEHME *et al.*, 2004; KUSHNIR-SUKHOV *et al.*, 2006; MÜLLER *et al.*, 2009). Além de quimiotaxia, a 5-HT participa da produção de citocinas, como demonstrado em murinos, em que macrófagos peritoneais aumentaram a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6 (GHIA *et al.*, 2009), e em humanos, nos quais 5-

HT alterou a produção de citocinas pelas DCs via 5-HTR4 e 5-HTR7 e modulou a diferenciação de DCs, de monócitos e de precursores dos macrófagos (AHERN, 2011).

A expressão de 5-HTRs em células do sistema imune inato e adquirido, bem como a capacidade dessas células em usar 5-HT na resposta imune (AHERN, 2011; BAGANZ AND BLAKELY, 2013), acrescido do fato de que uma parcela de 5-HT presente na periferia pode se ligar à superfície de osteoblastos com consequente inibição da sua proliferação celular (YADAV *et al.*, 2008), e que inibição da 5-HT do TGI pode favorecer osteoblastogênese e formação óssea (YADAV *et al.*, 2010), são evidências de que a 5-HT tem ação na resposta imune e pode, por mecanismos diversos, estar envolvida na etiopatogênese da AR.

A 5-HT também foi descrita como elemento influenciador da resposta imune adquirida. A depleção de 5-HT utilizando paraclorofenilalanina, um inibidor irreversível da TPH, suprimiu a capacidade dos macrófagos de ativar células T (BAGANZ AND BLAKELY, 2013), enquanto que DCs estimuladas por 5-HT desencadearam mais resposta inflamatória imune adaptativa (LI *et al.*, 2011). Os linfócitos B também são ativados pela 5-HT em combinação com fator ativador de plaquetas (MATSUMURA *et al.*, 2006); também tem sido identificado o papel da 5-HT como sinal endógeno de ação autócrina e/ou parácrina na ativação e na proliferação de células T (LEÓN-PONTE *et al.*, 2007).

Em modelos de artrite, foi demonstrado que a injeção intra-articular de 5-HT causa inflamação articular e dor, enquanto sua depleção atenua a gravidade da doença (FAKHFOURI *et al.*, 2012). Os níveis de 5-HT também estavam elevados em líquidos sinoviais, tendo sido liberada por plaquetas ativadas e induzindo mediadores inflamatórios (WANG *et al.*, 2004; SEIDEL *et al.*, 2008).

1.5 Justificativa do estudo

Apesar dos avanços inquestionáveis no entendimento da etiopatogênese da AR e de suas implicações para o diagnóstico, o seguimento e a terapêutica, muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas para que um melhor desfecho seja oferecido aos indivíduos com a doença. Mais do que identificar um fator de risco que seja único, genético, epigenético e/ou ambiental, procura-se compreender a interação que existe entre o fator e como este repercute para a suscetibilidade da

doença. A partir disso, será possível então criar ferramentas preditoras de diagnóstico, de prognóstico e de resposta ao tratamento, baseando-se na contribuição individual ou combinada de cada um desses fatores de risco.

Até o momento, não há dados na literatura que avaliem o polimorfismo do gene da IDO1 e o risco de desenvolver AR, nem como essas variações genéticas podem influenciar a função enzimática da IDO1 e os fenótipos da AR. O presente estudo investigou a associação entre os polimorfismos rs7820268, rs3739319, rs9298586, rs61753677, rs35099072 e rs35059413 do gene da IDO1 e o risco de desenvolver AR, bem como, as repercussões dessas variantes genéticas na atividade da enzima IDO1, na concentração de 5-HT e nos aspectos clínicos e laboratoriais da AR na busca de novos preditores de risco.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar a atividade da enzima IDO1 e as concentrações do Trp, Kyn e 5-HT no plasma de indivíduos com AR, e também se há associação entre esses valores e presença de fatores de risco e de mau prognóstico para a doença;
2. Determinar frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos do gene da IDO1 em população de AR e de controles saudáveis, além de verificar associações entre essas variantes genéticas e o risco de desenvolver AR;
3. Avaliar associações entre os polimorfismos do gene da IDO1 e a presença de fatores de risco e de mau prognóstico para AR.

3 INDIVÍDUOS, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo caso-controle, resultado da colaboração entre o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e o Hospital Estadual de Ribeirão Preto (HERP).

3.2 Seleção dos indivíduos

No período de novembro de 2015 a abril de 2016, foram selecionados voluntários com idade maior ou igual a 18 anos para formação de grupos de indivíduos com AR e de controles saudáveis. Foram considerados como critérios de exclusão, para formação de ambos os grupos, a presença de neoplasia(s), de outras DAIs, de infecções ativas e/ou de infecções crônicas e do uso de prednisona ou equivalente em dose maior ou igual a 7,5 mg ao dia.

A inclusão de indivíduos com AR para o estudo foi realizada por conveniência e ocorreu nos ambulatórios de reumatologia do HCFMRP-USP e do HCPA-UFRGS, após os pacientes preencherem os critérios de classificação de AR do ACR 1987 e/ou ACR/EULAR 2010 (ARNETT *et al.*, 1988; ALETAHA *et al.*, 2010) (Anexos A e B), independentemente do grau de atividade da doença que apresentavam e da terapia para AR que estavam em uso. Os indivíduos de AR em uso de MMCDs, no entanto, deveriam estar com dose estável das medicações há pelo menos doze semanas.

A seleção de indivíduos não-casos de AR para formação do grupo controle ocorreu nos ambulatórios do HCFMRP-USP, do HCPA-UFRGS e do HERP, de janeiro a abril de 2016, sendo realizada aleatoriamente após ter sido checado se os indivíduos tinham mais de 18 anos de idade e se preenchiam os critérios de exclusão mencionados anteriormente.

Todos os indivíduos incluídos no estudo foram capazes de compreender e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos C, D e E). Após seleção e formação de ambos os grupos, apenas foram retirados do estudo os indivíduos que não retornaram às consultas, que desistiram de participar da

pesquisa após o seu início e/ou que tiveram material inadequado para análises propostas.

Foram selecionados 171 pacientes com AR no HCFMRP-USP e 157 no HCPA-UFRGS, sendo o grupo total formado por 328 pacientes. Desses, 18 foram selecionados aleatoriamente para participarem, além do estudo genético, da análise dos metabólitos do Trp. Quanto ao grupo não-casos de AR, 121 indivíduos foram provenientes de Ribeirão Preto e 113 de Porto Alegre, sendo que 18 desses 121 voluntários participaram das etapas de estudo genético e metabólico.

3.3 Coleta de dados e caracterização dos grupos

Para caracterização dos indivíduos de AR selecionados no HCFMRP-USP, foram utilizados a ficha para coleta de dados clínicos (Anexo F) e o questionário do *HAQ* (Anexo G). O preenchimento desses instrumentos ocorreu através de entrevista e exame físico na ocasião da consulta médica, e sempre realizado por um mesmo avaliador, reumatologista.

Para obtenção dos dados laboratoriais, foi feita a coleta de 10 mL de amostra de sangue periférico em tubo com EDTA e de 5 mL em tubo com gel separador, de todos os indivíduos participantes do estudo. Para os indivíduos que participaram do estudo dos metabólitos do Trp também foi realizada coleta de 5 mL de sangue periférico em tubo com heparina. As amostras foram, então, encaminhadas para os laboratórios do HCFMRP-USP para prosseguimento dos testes propostos.

As informações de interesse coletadas para os grupos de Ribeirão Preto estão discriminadas no Anexo F. Para os voluntários saudáveis, apenas tabagismo, uso de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), e valores de plaquetas e de PAls foram investigados entre os dados clínicos e laboratoriais listados.

Os dados referentes aos indivíduos de AR e voluntários saudáveis selecionados nos ambulatórios do HCPA-UFRGS foram encaminhados juntamente com as amostras de DNA genômico (DNAg). Desses indivíduos, foram fornecidas as seguintes informações:

- Dados gerais: nome, registro do prontuário, data e local da coleta de dados e das amostras, procedência, sexo, data de nascimento, etnia;

- Dados clínicos e laboratoriais: duração dos sintomas; presença de tabagismo; presença do SE, FR e anti-CCP.

Para o pareamento dos grupos de AR e de controles saudáveis, foram considerados dados sobre sexo, etnia, idade, presença de tabagismo e, no estudo dos metabólitos do Trp, do uso de ISRS.

Os fluxogramas da figura 7 e 8 apresentam os grupos formados nas etapas do estudo genético e do metabólitos do Trp, respectivamente, com as metodologias empregadas para as coletas dos dados clínicos e das amostras de sangue periférico.

Figura 7– Fluxograma da coleta de dados para o estudo genético

Fonte: o autor.

Figura 8 – Fluxograma da coleta de dados para o estudo dos metabólitos do Trp.

Fonte: o autor

3.4 Estudo dos metabólitos do Trp

Essa etapa foi realizada em colaboração com o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPS), vinculado à Faculdade das Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, sob a coordenação do professor doutor Norberto Poperine Lopes.

3.4.1 Seleção dos metabólitos do Trp a serem avaliados

Foram selecionados para serem quantificados e analisados os metabólitos Trp, Kyn e 5-HT. Como avaliação indireta da atividade da enzima IDO1, foi utilizada a relação Kyn/Trp.

3.4.2 Separação e preparação do plasma

Para essa etapa, 5 mL de sangue periférico foram coletados em tubo com heparina e encaminhados ao laboratório de Imunologia Clínica do HCFMRP-USP, onde foram centrifugados a 6800g e a -4°C, por 10 minutos. O plasma foi separado como sobrenadante e recolhido por pipeta eletrônica, colocado em microtubo e armazenado a -20°C.

Para o preparo das amostras, 200 μL de plasma foram transferidos para microtubo e acrescidos de 400 μL de metanol gelado. Essa solução foi agitada em vórtex por dois minutos e centrifugada a 14000g, a 4 °C, por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante obtido foi dividido em dois grupos: 300 μL foram transferidos para um eppendorf de 1500 μL e submetidos a um concentrador de amostras a vácuo por 2h, até secagem completa do solvente (preparo 1). Outros 100 μL foram colocados em eppendorf, diluídos com 300 μL de ácido fórmico a 0,5%, filtrados em membranas de 13 mm PTFE 0,22 μm descartáveis para vial, a fim de obter 5 μL de solução que foram injetados no cromatógrafo líquido (preparo 2).

Ao preparo 1, foram adicionados 80 μL de ácido fórmico 0.5%, 10 μL de metanol e 200 μL de hexano ; em seguida, a solução obtida foi agitada em vórtex por dois minutos e centrifugada a 14000g, a 4 °C, por 10 minutos. A porção inferior foi filtrada em membrana de 4 mm PTFE 0.22 μm descartáveis, transferida para vial e 5 μL foram injetados no cromatógrafo líquido.

3.4.3 Quantificação de Trp, Kyn e 5-HT

A metodologia analítica para quantificação de Trp, Kyn e 5-HT foi desenvolvida por cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE) acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (CLUE-DAD-EM/EM). O sistema utilizado foi ACQUITY TQD UPLC-MS Waters®, com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador triplo quadrupolo. A separação cromatográfica foi obtida utilizando uma coluna KINETEX 1.7 μm F5, com dimensões de 2.1 x 50 mm. Já a fase móvel foi composta por acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico e água contendo 0.5% de ácido fórmico. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C e as amostras acondicionadas a 10°C no injetor automático. O fluxo de fase móvel foi de 0,2 mLmin⁻¹ e o volume de injeção foi de 5 μL . Os seguintes gradientes de fase móvel foram empregados (tabela 3.1):

Tabela 3.1 – Gradiente de fase móvel utilizado no método por CLUE-DAD-EM/EM para análise simultânea de 5-HT, TRP e KYN.

Tempo (minutos)	% de Acetonitrila (1% de ácido fórmico)
--------------------	--

Continua

Continuação

Tempo (minutos)	% de Acetonitrila (1% de ácido fórmico)
0	1
6.4	30
8.4	70
8.41	1
12.00	1

Fonte: O autor

Para a quantificação dos analitos, foi utilizado o método MRM (*multiple reaction monitoring*) no modo positivo de ionização. Os parâmetros de *tune* MS foram ajustados para sensibilidade adequada do método, e as energias de cone e colisão foram ajustadas para cada analito (Tabelas 3.2 e 3.3). Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC (J.T. Baker[®]), além de água ultrapura (18,2 mΩ, Milli-Q, Millipore[®]).

Tabela 3.2 – Parâmetros de *tune* do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação de 5-HT, TRP e KYN.

Parâmetros ajustados no MS TUNE			
Capilar	2.0 kV	LM resolução 1	6.0
Cone:	-	HM resolução 1	10.0
Rf lentes	0.1	energia do íon 1	0.8
temperatura da fonte:	150 °C	Entrada	1.0
temperatura de dessolvatação	350 °C	Colisão	-
fluxo de gás de dessolvatação (nitrogênio)	750 L.h ⁻¹	Saída	2.0
fluxo de gás no cone (nitrogênio)	75 L.h ⁻¹	LM resolução 2	6.0
Fluxo do gás de colisão (argônio)	0.16 L.h ⁻¹	HM resolução 2	10.0
Pressão na cela de colisão	3,02.10 ⁻³	energia do íon 2	1.0

Fonte: o autor.

Tabela 3.3. Parâmetros do método MRM para quantificação simultânea de 5-HT, TRP e KYN (modo positivo de ionização)

Substância	Íons monitorados	Energia no cone (kV)	Energia de colisão (eV)
5-HT	177 > 160	12	10

Continua

Continuação

Substância	Íons monitorados	Energia no cone (kV)	Energia de colisão (eV)
Kyn	209 > 192	16	10
Trp	205 > 188	14	10

Fonte: o autor

3.5 Estudo genético

3.5.1 Seleção das variantes do gene da IDO

As variantes genéticas da IDO1 para análise foram selecionadas a partir de revisão de literatura, baseando-se nos polimorfismos descritos na população geral e nos estudos de associação de risco para DAI, já que não há dados relativos a essas variantes em populações de AR.

Os seis polimorfismos do gene da IDO1 eleitos para o estudo são do tipo SNP, em que um dos nucleotídeos está alterado em relação ao alelo selvagem, levando ao aparecimento dos genótipos homozigoto selvagem ou primitivo, heterozigoto e homozigoto mutado. As características das variantes genéticas estudadas com as nomenclaturas oficiais (NCBI) estão apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4- Caracterização dos polimorfismos do gene da IDO1 estudados

Número [#]	ID variante	Posição	Intron/Exon	MAF ^{&}	Mudança do par de bas
1	rs7820268	11202	Íntron 4	T = 0.2248/1126	TTCAAT[C/T]AAATAG
2	rs3739319	18994	Íntron 9	A = 0.4129/2068	ACCTCC[G > A]TATTTTC
3	rs9298586	16080	Íntron 8	G = 0.0950/476	CAAAAA[T > G]TCACAT
4	rs61753677	11294	éxon 5	T = 0.0068/34	TAAGGC[C > T]CCTGAC
5	rs35099072	9326	éxon 3	A = 0.0028/14	CACAGC[G> A]CCTTGC
6	rs35059413	5124	éxon 1	A = 0.0080/40	GCACAC[G > A]CTATGG

[#] Fornecido aleatoriamente para facilitar a comunicação nesse estudo

Dados fornecidos na base de dados NCBI SNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snp)

[&] Menor frequência alélica (do inglês, minor allele frequency, MAF) refere-se ao segundo alelo mais comum na posição onde uma sequência variante foi identificada, em uma população de 1000 genomas.

Fonte: O autor.

A representação esquemática do gene IDO1 com a localização dos polimorfismos estudados está estruturada na figura 9. As linhas em vermelho correspondem aos éxons. A linha preta, que se conecta às linhas vermelhas, corresponde aos íntrons.

Figura 9 – Representação esquemática do gene da IDO1 com as variantes estudadas.

Fonte: Adaptado

3.5.2 Extração do DNAg

Para extração do DNAg, foram coletados 10 mL de sangue periférico, em tubo de EDTA (5mL em cada tubo), de todos os indivíduos com AR e os controles selecionados no HCFMRP-USP e no HERP na mesma ocasião, conforme apresentado na figura 7. Essas amostras (n=292) foram encaminhadas ao laboratório de Imunologia Clínica do HCFMRP-USP, onde foram realizadas a extração do DNAg pelo procedimento de *salting-out*, descrito por Miller e colaboradores (MILLER *et al.*, 1988).

Por esse método, as amostras de sangue periférico coletadas eram armazenadas em temperatura de 4-6°C por 24hs, ocorrendo, então, sedimentação espontânea, com separação em plasma e em sangue total. Este, por sua vez, era alocado em tubo de polipropileno de 50 mL para adição de 40 mL de tampão de lise I (sacarose 3M, Tris-HCl 5M e Triton X-100 a 1%), ocorrendo a lise de glóbulos vermelhos. Posteriormente, a solução era homogeneizada e centrifugada por 10 min a 2500 rpm. Em seguida, era realizada nova suspensão com o botão de células remanescentes no fundo do tubo e com adição do tampão de lise II (NaCl 0,075M,

Na-EDTA 0,024, 25 mM de NaClO₄H₂O e SDS a 2,5%), exposto a 15 segundos no agitador de tubos (vórtex), ocorrendo lise de glóbulos brancos. Após essa etapa, eram adicionados 2 mL de NaCl 6M e, logo após, a solução foi novamente centrifugada. O sobrenadante, que continha o DNAg, era desprezado em novo tubo de polipropileno, e então foram adicionados 5mL de álcool isopropílico. Após homogeneização cuidadosa, o DNAg era individualizado, transferido para tubo eppendorf e lavado com 1,5 mL de álcool a 70%. Após secagem do DNAg, este foi quantificado por espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis), com valores mínimo de 23,2 e máximo de 3328,3 ng/μl, e armazenado em temperatura (T) de -70°C, conforme consentimento dos participantes (Parecer HCFMRP-USP n° 11566/2015).

3.5.3 *Análise das variantes do gene da IDO1 por reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)*

Após a extração do DNAg, a genotipagem do polimorfismo do gene IDO1 foi realizada em 557 amostras, entre indivíduos com AR e controles, de ambas as cidades, no laboratório Multiusuário da FMRP-USP, utilizando a plataforma Viia 7 (*Applied Biosystems*).

O método utilizado foi o de discriminação alélica por reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR, do inglês, *polymerase chain reaction quantitaive real time*). Foi utilizada a mistura de reagentes *TaqMan 2x Universal Master Mix®* (*Applied Biosystems*, CA), que tem como componentes essenciais: enzima DNA polimerase, iniciadores da reação (*primers*), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) e tampões, sondas de hidrólise do tipo MGB (do inglês, *minor groove binding*) da marca *TaqMan®* (*Applied Biosystems*) e ligantes fluorogênicos FAM, VIC e ROX da *Life®*.

As reações de genotipagem foram feitas em placas de 96 poços, distribuídas da seguinte maneira: um poço preenchido por DNA de genótipo conhecido (homozigoto selvagem, homozigoto mutado ou heterozigoto), como controle positivo, e outro poço preenchido com água, sem DNA, como controle negativo, para afastar a possibilidade de contaminação com outro DNA. Os demais poços continham, cada um, 2,5 μL de *TaqMan 2x Universal Master Mix®* (*Applied Biosystems*, CA), 0,25 μL de *primer-probe* (ensaio *TaqMan®* SNP Genotyping

Assays - Applied Biosystems , de acordo com cada um dos polimorfismos descritos na tabela 3.4 –470 nM e 100 µM, respectivamente), 1,0 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL e 1,25 µL de água UltraPure™ Distilled Water (DNase, RNase free - Gibco®), segundo o manual do fabricante.

As reações de RTQ-PCR seguiram um programa de termociclagem que consistiu em leitura pré-PCR à temperatura (T) de 60°C durante um minuto; aquecimento a T de 95°C por 10 minutos; desnaturação das fitas de DNA após 40 ciclos a T de 95°C por 15 segundos; anelamento a T de 60°C por um minuto; leitura pós-PCR a T de 60°C por um minuto. Na fase de hibridação da PCR, as sondas de hidrólise *TaqMan*® se ligaram à sequência alvo, com a qual apresentavam total complementaridade, e, posteriormente, eram detectadas pela enzima *TaqDNA* polimerase, que as hidrolisava pela atividade exonucleotídica 5'-3'.

Após realização dos ciclos de RT-PCR, gráficos de fluorescência foram adquiridos através de um sistema de detecção de fluorescência. As curvas de amplificação de cada genótipo foram caracterizadas de acordo com o comprimento de onda de excitação e emissão para as sondas que estavam marcadas com carboxifluoresceína, FAM em 485nm e 535nm e VIC em 535nm e 590 nm. A curva ROX serviu para normalizar a reação em relação à fluorescência.

3.5.4 Tipificação do HLA-DR

O DNAG extraído na etapa 3.5.2 também foi utilizado para a tipificação do HLA-DR, realizada no laboratório de histocompatibilidade do Hemocentro de Ribeirão Preto. Após exclusão de amostras inadequadas e/ou insuficientes para a análise, um total de 310 amostras de DNAG de portadores de AR tiveram o HLA-DR tipificado, sendo 165 amostras provenientes de Ribeirão Preto e 145 de Porto Alegre.

O método utilizado nessa etapa foi baseado na amplificação do DNAG por meio de iniciadores genéricos na região de classe II a ser estudada. Para esse estudo, foram usados iniciadores que amplificaram sequências específicas dos diversos alelos DRB1, utilizando-se o kit LABType™ SSO DRB1 HD (One Lambda, Canoga Park, CA) que continha: mistura de microesferas contendo um conjunto de sondas de oligonucleotídeos de sequências específicas (SSO); tampões para reação de hibridização; tampão para lavagem do DNA; tampão de estreptovidina-ficoetrina

(SAPE); mistura de *primers* específicos para cada *locus* (A, B, C, DRB1, DQA1 e DQB1); e mistura tampão especialmente formulada para amplificação do DNA (D-mix). Para obtenção dos resultados, ainda foram necessários um analisador de fluxo e um *software* específico.

A tipificação do HLA ocorreu de acordo com as seguintes etapas, a seguir detalhadas:

Etapa 01 - Amplificação dos genes para metodologia PCR- SSO

Para amplificação dos genes HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQA1/DQB1, e para a posterior identificação dos respectivos grupos alélicos, as amostras de DNAg foram inicialmente descongeladas e, após homogeneização no vórtex, 1 a 2 µL foram colocados em cada poço, de uma placa de 96 poços. No controle negativo, foi colocado 1µl de água estéril. Para cada amostra de DNAg, foram acrescentados 8,49 µl da mistura com 6,9µl de mistura de amplificação D-mix, 2µl de *primers* de amplificação, e 0,1µl de Taq-polimerase. Posteriormente, essa placa de 96 poços, contendo DNA e mistura de amplificação, era colocada no termociclador PE-2400 ou PE-9600 (Perkin Elmer, EUA) para a realização da PCR.

Etapa 02 - Eletroforese dos produtos amplificados pela PCR-SSO

As amostras de fragmentos de DNAg amplificados através da PCR foram aplicadas em gel de agarose corado com brometo de etídeo (EtBr) e submetidos a uma corrente elétrica. O objetivo dessa etapa era determinar se a amplificação dos éxons 2 e 3 dos locos HLA-A, -B e -C e do éxon 2 do loco -DRB1 e DQA1/DQB1 tinha ocorrido, e se os fragmentos corretos de DNA foram amplificados pela PCR. Se o DNA estava amplificado de forma correta e específica, duas bandas coradas com EtBr apareceriam no local apropriado, determinado pelo par de *primers* específicos para os éxons 2 e 3 dos locos HLA-A, -B e -C, e uma banda para o par do loco -DRB1 e DQA1/DQB1. A preparação do gel foi feita com 1,25g de agarose e 50 ml de tampão, que eram fervidos em forno microondas até dissolução de toda agarose, sendo depois transferidos 60 ml da solução para um béquer e adicionado 1 µl de BrEt. Em seguida, foram transferidos 1,5 µl do produto amplificado em cada poço do gel e conectada a cuba eletroforética a 150 V por 6 a 10 minutos. Após esse período, a cuba era desligada, o gel nela presente era retirado com uma espátula e transferido para avaliação no transiluminador ultravioleta. O gel era então fotografado para análises e interpretação de resultados.

Etapa 03 - Hibridização para metodologia PCR-SSO

Em cada poço limpo, de uma placa de 96 poços, foram transferidos 1,25µl do tampão de desnaturação e, em seguida, adicionados 2,5µl da amostra de DNA amplificado para locus -A, -B e -C e 1 µl para locos -DRB1 e DQA1/DQB1 que, então, foram homogeneizados no agitador de placas. A placa foi incubada em T entre 18° a 26° por 10 minutos, sendo adicionados 2,5 µl do tampão de neutralização em cada poço com a placa em banho de gelo e novamente homogeneizada no agitador de placas. Em cada poço, foram adicionados 17,8µl da mistura de hibridização, composta por 2µl da mistura de microesferas e 17µl do tampão de hibridização. As lavagens pós-hibridização foram realizadas por três vezes e consistiram em passar a placa no vortéx a baixa velocidade, colocá-la no termociclador a 60°C por 15 minutos, e posteriormente adicionar 40µl de tampão de lavagem a cada poço para centrifugação da placa por mais cinco minutos a 1000g-1300g.

Etapas 04 - Marcação (Biotinilação)

Finalizada a hibridização, foram adicionados a cada poço, que já continham o DNAg, 23,7µl de uma solução contendo 0,25µl de SAPE e 24,75µl de tampão de SAPE. A placa foi levada ao termociclador a 60°C por cinco minutos. Após esse período, foram adicionados 40µl de tampão de lavagem em cada poço para centrifugação da placa por mais cinco minutos a 1000g-1300g, com posterior remoção do sobrenadante e adição de mais 65µl de tampão de lavagem. Posteriormente, a solução foi homogeneizada e transferida para uma placa de leitura, que foi então coberta com papel alumínio e mantida no escuro a 4°C até ser levada ao LABscan™ 100 (Luminex) para leitura.

Etapas 05 - Visualização com Luminex e análise dos resultados

As placas com DNAs complementares conjugados com microesferas e com codificação fluorescente obtidas eram levadas ao analisador de fluxo, LABscan™ 100, utilizado conforme protocolo de uso do equipamento. A média de intensidade da fluorescência da ficoetrina em cada microesfera era identificada e calculada conforme *software* do equipamento (HLA-Fusion) que, baseada no padrão de reações positivas, era revelada pela intensidade da fluorescência da ficoetrina de cada amostra de DNA e pelo conjunto das sondas utilizadas. As microesferas de uma determinada tonalidade eram conjugadas em um único tipo de sonda. Os dados foram salvos em arquivo e a atribuição da tipagem HLA foi baseada no padrão de reação em relação aos padrões associados com sequências de genes já publicados.

A reação foi considerada positiva quando a porcentagem de valores positivos para a sonda em questão era mais alta que o corte pré-definido para ela, e negativa quando a porcentagem de valores positivos era inferior a esse valor de corte. Indivíduos que tiveram valores fora desses intervalos foram excluídos do estudo.

3.6 Definição de variáveis

3.6.1 Variáveis independentes

a) Polimorfismo do gene IDO1 e do HLA-DRB1

Os indivíduos foram divididos em dois grupos para cada polimorfismo da IDO1 estudado, e em dois grupos quanto à presença do SE. Quanto às variantes da IDO1 estudadas, as categorias foram a presença ou a ausência do alelo mutado. Quanto ao HLA-DRB1, foi considerado como presença do SE a ocorrência, no indivíduo, de um ou dois dos alelos de risco HLA-DRB1: *0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1001, *1402.

b) Tabagismo

A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (Reichert *et al.*, 2008) classifica, como não fumante, o indivíduo que nunca fumou ou que fumou menos que 100 cigarros na vida e não fuma atualmente; como ex-fumante, o indivíduo que fumou mais de 100 cigarros na vida e não fuma atualmente; e, como fumante ativo, o indivíduo que fumou no mínimo 100 cigarros na vida e que atualmente fuma diariamente ou ocasionalmente. Contudo, para evitar a ocorrência de viés de memória – e corroborado por dados na literatura que mostram que o tabagismo pode elevar em mulheres o risco de desenvolver AR mesmo após dez anos da exposição ao tabaco, e que esse risco se mantém por até vinte anos após suspensão do hábito (Costenbader *et al.*, 2006) –, foi considerado para esse estudo, como tabagista, o indivíduo que fuma ou tenha fumado ativamente por qualquer período de tempo e, como não tabagista, o indivíduo que nunca fumou ativamente.

3.6.2 Variáveis dependentes

a) Duração dos sintomas

Tempo, em meses, do início dos sintomas referentes à AR até a data da coleta da informação na entrevista.

b) Positividade para anticorpos

Foram realizadas as pesquisas do FR e do anti-CCP. O FR (UI/ml) foi determinado por nefelometria, segundo as especificações do fabricante, e adotado como positivo os valores acima de 10 UI/ml. Já o anti-CCP (UI/ml) foi obtido por ELISA através de teste semiquantitativo para detecção de anticorpos igg anti-CCP3 (Quanta Lite® CCP 3 igg Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA), conforme as especificações, tendo sido considerados como positivos aqueles testes com resultados maiores que 20 U/ml. Foi definido, como fator de pior prognóstico, a presença de FR e/ou anti-CCP positivos (Smolen *et al.*, 2014) (Singh *et al.*, 2012), e, como altos títulos, os valores maiores que três vezes o valor de referência (Aletaha *et al.*, 2010).

c) Número de articulações dolorosas (AD) e edemaciadas (AE)

Foi obtido através da contagem dentre 28 articulações possíveis (10 interfalangeanas proximais, 10 metacarpofalangeanas, dois punhos, dois cotovelos, dois ombros e dois joelhos) por meio de exame físico apropriado.

d) Valor da avaliação global do paciente

Obtido através da EVA, que consiste em uma pontuação, que pode variar de zero a 10 (mm) e que é informada pelo próprio indivíduo. Pontuações mais próximas ao zero correspondem a melhores impressões da saúde global.

e) PCR (mg/dL)

Obtida quantitativamente por método imunoturbidimétrico com látex espectrofotometria. Foi considerado alterado o resultado acima de 0,6 mg/dl, tendo sido este o valor de referência adotado.

f) VHS (mm/h)

Obtido por análise cinética do fluxo por microfotometria e por capilaridade, utilizando o aparelho ROLLER 20 PN e seguindo as especificações do fabricante. Foi considerado alterado o resultado acima de 10 mm na 1ª hora.

g) Valores do DAS-28 com PCR (mg/dl)

Foi utilizado o endereço https://www.das-score.nl/das28/DAS_Scalculators/dasculators.html para a obtenção dos valores. A equação que representa o cálculo do DAS-28 PCR está descrita na tabela 1.1.

h) Classificação quanto ao grau de atividade da doença pelo cálculo do DAS-28 PCR

Determinada a partir das referências listadas na Tabela 1.1.

i) Critério de resposta EULAR ao MTX (Van Gestel *et al.*, 1996):

A resposta ao MTX, com dose que variou de 15mg a 25mg por semana, foi avaliada nos primeiros três meses de uso da medicação, a partir dos valores do DAS-28 com PCR (mg/dl). O DAS-28 PCR foi obtido antes do início do MTX e após três meses do seu início. Foram considerados os valores da tabela abaixo para classificação de resposta:

Tabela 3.5 – O critério de resposta EULAR baseado no DAS28

DAS-28 inicial	Redução do DAS-28		
	> 1.2	> 0.6 e ≤ 1.2	≤ 0.6
≤ 3.2	boa	moderada	nenhuma
> 3.2 e ≤ 5.1	moderada	moderada	nenhuma
> 5.1	moderada	nenhuma	nenhuma

Fonte: Adaptado de (Van Riel and Renskers, 2016)

j) HAQ

Obtido após aplicação do questionário, já validado no nosso meio (Ferraz *et al.*, 1990), constituído por vinte perguntas relacionadas a oito áreas determinadas

de atividades diárias. O valor do HAQ foi obtido após o indivíduo de AR graduar, em uma escala de zero a três, a dificuldade em realizar cada uma das atividades mencionadas no anexo G, sendo considerado como escore final o resultado da média aritmética do somatório do maior escore em cada uma das oito áreas. O escore total variou de zero (excelente função) a três (muito ruim).

k) Concentração plasmática de Trp, Kyn e 5-HT

Mensurada a partir do método descrito na seção 3.4. Os valores foram inicialmente obtidos em ng/ml. Para os valores de Trp e Kyn foi realizada a conversão de ng/ml para $\mu\text{mol/L}$, a fim de facilitar a disposição visual nas tabelas e a comparação com dados de estudos prévios. Para essa conversão, foram utilizadas as massas molares de 204,23 g/mol para Trp e de 208,22 g/mol para Kyn. Para a 5-HT, a unidade de ng/ml foi mantida devido aos reduzidos valores encontrados.

m) Razão Kyn/Trp (KTR)

Calculada a partir das concentrações plasmáticas da Kyn e do Trp, com unidade adotada de $\mu\text{mol/mol}$. A KTR é reconhecida como um indicador indireto válido de atividade da enzima IDO1 (SCHRÖCKSNADDEL *et al.*, 2006).

3.6.3 Variável moderadora

a) Sexo:

Os indivíduos foram classificados em feminino e masculino.

3.7 Análise estatística

Para responder aos objetivos do estudo, foram utilizadas técnicas básicas de análise exploratória – média, mediana, desvio padrão e análises de frequência –, e metodologias estatísticas – entre elas, o teste não paramétrico de Wilcoxon Mann-Whitney e o teste exato de Fisher. As análises foram realizadas com o *software* INSTAT3.

Para todas variáveis quantitativas foi realizado o teste de normalidade. O teste não paramétrico de Wilcoxon Mann-Whitney, por sua vez, foi utilizado para a

comparação de tendência central das variáveis quantitativas que não apresentavam distribuição normal. Para as variáveis que passaram pelo teste de normalidade, foi utilizado o teste t não pareado. Já para verificar a associação das variáveis qualitativas, o teste exato de Fisher foi o escolhido e o aplicado. Todos os testes de hipóteses desenvolvidos nesse trabalho consideram uma significância de 5%, isto é, a hipótese nula foi rejeitada quando p-valor foi menor que 0,05. *Odds ratio* (OR) e intervalos de confiança (IC) foram usados para estimar a força das associações.

3.8 Considerações éticas

O projeto, originalmente intitulado "Análise do polimorfismo do gene da indoleamine 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) em pacientes com artrite reumatoide", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP e aprovado em 23/11/2015, de acordo com o processo nº. 11566/2015 (anexo H), e pelo CEP do HERP, em relação à seleção de indivíduos do grupo controles, tendo sido aprovado em 09/12/2015 (anexo I).

Atrelado ao projeto de pesquisa supracitado, foi autorizada a criação de um "Biorrepositório de pacientes de artrite reumatoide", vinculado ao serviço de Reumatologia/Clínica Médica-HCRP. Para o armazenamento das amostras obtidas de DNA, de plasma e de soro, os participantes do estudo assinaram um TCLE (anexo D), sendo garantidos sigilo e confidencialidade dos doadores.

Todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo foram informados previamente sobre seus objetivos e suas etapas, bem como, dos tipos de exames a serem realizados e do sigilo das informações e dos dados obtidos. Todos os participantes assinaram os TCLEs (anexos C, D e E).

3.9 Financiamento

Esse projeto foi realizado com o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto CEPID-CRID (processo nº: 2013/08216-2).

4 RESULTADOS

4.1. Estudo dos metabólitos do Trp

A análise das concentrações plasmáticas dos metabólitos Trp, Kyn, 5-HT, bem como a relação Kyn/Trp (KTR) foi realizada apenas em um subgrupo, formado por 18 indivíduos de AR e por 18 de controles saudáveis, selecionados aleatoriamente a partir das amostras de AR (n=171) e de indivíduos saudáveis (n=121) de Ribeirão Preto que participaram do estudo genético.

4.1.1 *Análise descritiva dos dados clínicos e laboratoriais*

A análise descritiva das características clínicas e laboratoriais dos indivíduos de AR está apresentada na tabela 4.1.

Dentre os 18 indivíduos com AR, 88,8% (n=16) eram do sexo feminino e 38,8% (n=7) eram caucasianos e tabagistas. O tempo médio da doença observado nessa população foi de 79 meses, com intervalo de confiança variando de 64 a 93 meses. Quanto à presença de anticorpos, 44,5% dos indivíduos foram positivos para FR, sendo o valor médio entres estes de 95 UI/ML. Já 55,5% tiveram resultados positivos de anti-CCP, com média de valor de 117 U/ML, em um intervalo que variou de 61 a 174 U/ML. Oito indivíduos (44,4%) eram carreadores do SE.

A média de AD, AE e EVA foi de 2.8, 2.1 e 49 mm, respectivamente, e os valores médios de VHS foram de 11.4 mm/1ºhora, com intervalo variando de 7mm a 16 mm/1ºhora, e os de PCR foram de 0.87 mg/dl, com intervalo variando de 0.2 a 1.5 mg/dl. Já a média de DAS28 PCR foi de 3.2, o que classifica a amostra de acordo com DAS28 PCR em baixa atividade inflamatória. Quanto ao HAQ, a média foi de 0.9, com intervalo de variação de 0.6 a 1.3, classificando a amostra, quanto à funcionalidade, em uma doença mais leve.

Quanto à terapia utilizada, dois indivíduos (11,1%) eram virgens de tratamento de AR; cinco (27,8%) estavam em uso de MTX, e um (5,5%) em uso de combinação de MTX e leflunomida; e 10 (55,6%) em uso de combinação de MMDC e biológico. 11 pacientes (61,1%) estavam sem usar prednisona, e os demais o faziam em dose inferior a 5mg/dia. Quanto ao uso de inibidores da recaptação de serotonina (ISRS), 44,4% (n=8) dos pacientes não faziam uso da medicação.

Tabela 4.1 – Parâmetros clínicos e laboratoriais dos indivíduos do grupo de AR (n=18)

Variáveis	n*	Média (± DP)	Mediana	Mínimo	Máximo	95% IC**
Idade (anos)	18	54.4 (± 12)	52.5	37	73	48.5 - 60.4
Sintomas (meses)	18	78.9 (± 27.9)	77	24	125	64.5 - 93.3
Positividade e valor do FR (UI/ml)	8	199.1 (±158)	178.5	14.7	437	66.8 - 331.3
Positividade e valor do anti-CCP (UI/ml)	10	223.2 (± 44.9)	224.5	165.7	302.2	191.5 - 255.3
nº. AD	18	2.8 (± 2.5)	2.0	0.0	8.0	1.6 - 4.1
nº. AE	18	1.6 (± 1.6)	1.0	0.0	4.0	0.8 - 2.4
EVA (0-100 mm)	18	49.2 (± 30.2)	50	0	100	34.1- 64.2
VHS (mm/1ºh)	17	11.4 (± 9.3)	7	2	31	6.64 - 16.2
PCR (mg/dl)	18	0.87 (± 1.3)	0.34	0.01	4.40	0.24 - 1.45
DAS28	18	3.2 (± 1.3)	3.1	1.2	5.8	2.7 - 3.9
HAQ	18	0.93 (± 0.7)	1.06	0.0	2.25	0.6 - 1.3

* número de indivíduos com dados disponíveis; ** IC da média.

FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpo contra o peptídeo cíclico citrulinado; nº. AD: número de articulações dolorosas; nº. AE: número de articulações edemaciadas; EVA: escala visual analógica; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C reativa; DAS28 PCR: escore de atividade da doença baseado em 28 articulações; HAQ: *Health Assessment Questionnaire*.

Fonte: o autor.

Já o grupo de indivíduos controles era predominantemente do sexo feminino (88,8%), sendo 38,8% (n=7) de caucasianos e 22,2% (n= 4) tabagistas, com média de idade de 51.9 anos. Quanto às provas de atividade inflamatória (tabela 4.2), estes indivíduos apresentaram média de valor de PCR de 0.74mg/dl e de VHS 7.9 mm/1ºhora.

Tabela 4.2 Parâmetros clínicos e laboratoriais dos indivíduos controles (n=18)

Variáveis	n*	Mediana	Média (± DP)	Mínimo	Máximo	95% IC**
Idade (anos)	18	49.0	51.9 (± 13.3)	34	79	45.3 - 58.5
VHS (mm/1º h)	17	6.00	7.9 (± 6.3)	2	26	4.65- 11.12
PCR (mg/dl)	12	0.51	0.74 (± 0.72)	0.04	2.62	0.28 - 1.20

* número de indivíduos com dados disponíveis; ** intervalo de confiança da média.

DP; desvio padrão; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C reativa.

Fonte: o autor.

Percebe-se, portanto, que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AR e controle quanto ao sexo, etnia, tabagismo e uso de ISRS (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Comparação dos parâmetros clínicos entre grupos de AR e controles saudáveis

Variáveis	Grupo AR n (%)	Grupo controle n (%)	OR (IC95%)	p-valor
Sexo feminino	16 (88.9)	16 (88.9)	1.00 (0.13-8.0)	1.39
Presença de tabagismo	7 (38.8)	4 (22.2)	2.23 (0.51-9,6)	0.47

Continua

Continuação

Variáveis	Grupo AR n (%)	Grupo controle n (%)	OR (IC95%)	p-valor
Uso de ISRS	5 (27.8)	1 (5.5)	6.54 (0.68-63.0)	0.18
Caucasianos	7 (38.8)	7 (38.8)	1.00 (0.26-3.82)	1.27

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

ISRS: inibidor seletivo da recaptação de serotonina

Fonte: o autor

4.1.2 Descrição dos níveis plasmáticos dos metabólitos do Trp

A tabela 4.4 e as representações gráficas das figuras 10, 11 e 12 apresentam as concentrações dos metabólitos do Trp estudados e a razão KTR a partir dos valores máximos e mínimos, das médias e das medianas. Em todas as análises, as médias de Trp, Kyn, 5-HT e KTR apresentaram menor valor no grupo AR quando comparado ao grupo controle.

Tabela 4.4.– Descrição do perfil de distribuição das concentrações plasmáticas dos metabólitos do Trp, estudados no grupo de indivíduos de AR e de controles

Estatística		Kyn (μmol/L)		Trp (μmol/L)		KTR (μmol/mol)		5-HT (ng/ml)	
		AR	Controle	AR	Controle	AR	Controle	AR	Controle
Mediana		2.25	2.65	61.70	67.75	37.41	35.36	1.6	26.9
Média		2.52	2.75	61.82	68.27	40.65	42.20	5.95	58.4
Desvio padrão		0.85	0.83	7.58	12.35	12.02	18.96	12.67	69.18
Valor mínimo		1.5	1.5	49.5	48.3	28.83	21.27	0.4	0.8
Valor máximo		5.1	4.4	76.3	89.3	70.20	90.54	54.6	203
IC 95%	Mínimo	2.09	2.33	58.05	62.13	34.67	32.77	24.03	34.2
	Máximo	2.94	3.17	65.60	74.41	46.63	51.63	92.85	53.6

IC: intervalo de confiança; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: O autor.

Figura 10 – Gráfico apresentando as concentrações plasmáticas da Kyn nos grupos de AR e de indivíduos controles.

** p-valor= 0.4153

Fonte: o autor.

Figura 11 – Gráfico apresentando as concentrações plasmáticas do Trp e nos grupos de AR e de indivíduos controles.

** p-valor= 0.0697

Fonte: o autor.

Figura 12 – Gráfico apresentando as concentrações plasmáticas da KTR (Kyn/Trp) nos grupos de AR e de indivíduos controles.

** p-valor= 0.7712

Fonte: o autor.

Figura 13 – Gráfico apresentando as concentrações plasmáticas da 5-HT nos grupos de AR e de indivíduos controles.

** p-valor= 0.0006

Fonte: o autor.

4.1.3 Comparação dos grupos de AR e de controles saudáveis quanto a aspectos demográficos, clínicos, laboratoriais, metabólitos do Trp e atividade da IDO

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à média de plaquetas ($p= 0.8792$), de Trp ($p= 0.0698$), de Kyns ($p= 0.4129$) e de KTR ($p= 0.7818$). Já para o valor plasmático médio de 5-HT houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0.0006$), sendo o valor do grupo de AR de 5.95 (DP ± 12.7) e o do grupo de indivíduos controles de 58.4 (DP ± 69.2).

Tabela 4.5 – Comparação de parâmetros clínicos e laboratoriais, metabólitos do TRP e atividade da IDO1 (KTR) entre grupos de AR e controles saudáveis

Variáveis	Grupo de AR			Grupo Controle			p-valor
	*	mediana	média ($\pm$ DP)	*	mediana	média ($\pm$ DP)	
Idade (anos)	18	52.5	54.4 (± 12)	18	49.0	51.9 (± 13.3)	0.5494
PCR (mg/dl)	18	0.34	0.87 (± 1.3)	12	0.51	0.74 (± 0.72)	0.7306
VHS (mm/1° h)	17	7.0	11.4 (± 9.3)	17	6.00	7.88 (± 6.3)	0.2041
Plaquetas (/)	18	261500	267388 (± 108953)	17	253000	262647 (± 71027)	0.8792
KYN ($\mu\text{mol/L}$)	18	2.25	2.52 (± 0.85)	18	2.65	2.75 (± 0.83)	0.4153
TRP ($\mu\text{mol/L}$)	18	61.70	61.82 (± 7.58)	18	67.75	68.27 (± 12.35)	0.0697

Continua

Continuação

Variáveis	*	mediana	média (± DP)	*	mediana	média (± DP)	p-valor
KTR (μmol/mol)	18	37.41	40.65 (±12.02)	18	35.36	42.20 (±18.96)	0.7712
5-HT (ng/ml)	18	1.6	5.95 (± 12.7)	18	26.9	58.4 (± 69.2)	0.0006

* número de indivíduos com dados disponíveis; DP: desvio padrão; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor.

Quando avaliado se esses menores níveis plasmáticos de 5-HT que foram encontrados em indivíduos de AR eram influenciados pelo uso de ISRS, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para qualquer um dos metabólitos do Trp e da KTR entre os pacientes que usavam e os que não usavam ISRS (tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e os da KTR dos indivíduos com AR, segregados quanto ao uso de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS)

Variáveis	Presença de ISRS (n=5)		Ausência de ISRS (n=13)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (μmol/L)	2.20	2.74 (±1.41)	2.30	2.43 (± 0.59)	0.6680
Trp (μmol/L)	60.50	61.06 (± 9.21)	63.20	62.12 (± 7.27)	0.8245
KTR (μmol/mol)	36.97	43.19 (±15.26)	37.85	39.67 (± 11.10)	0.6579
5-HT (ng/ml)	1.2	1.2 (± 0.74)	3.6	7.8 (± 14.6)	0.0593*

ISRS: inibidor da recaptação da serotonina; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina.

* teste não-paramétrico Mann-Whitney

Fonte: o autor.

4.1.4 Comparação do perfil de metabólitos do Trp estudados e da KTR em indivíduos com AR, quanto à presença de anticorpos

Foram realizadas análises para avaliar se haveria associação entre valores da KTR e dos metabólitos da via das Kyns quanto à positividade de FR ou de anti-CCP. Percebe-se, a partir dos resultados das tabelas 4.7 e 4.8, que não houve diferença estatisticamente significativa nas comparações.

Tabela 4.7 – Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR quanto à presença de FR

Variáveis	FR negativo (n=10)		FR positivo (n= 8)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	2.65	2.81 (±1.01)	2.10	2.16 (± 0.45)	0.09
Trp (µmol/L)	63.30	62.29 (± 6.63)	60.85	61.25 (± 9.09)	0.79
KTR (µmol/mol)	41.64	44.85 (±14.14)	35.01	35.39 (± 6.07)	0.08
5-HT (ng/ml)	1.4	8.4 (± 16.8)	2.0	2.9 (± 2.3)	0.3322

FR: fator reumatoide; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor.

Tabela 4.8 – Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR quanto à presença do anti-CCP

Variáveis	Anti-CCP negativo (n=8)		Anti-CCP positivo (n= 10)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	2.65	2.8 (±1.05)	2.1	2.3 (± 0.63)	0.2651
Trp (µmol/L)	63.75	64.51 (± 5.3)	60.0	59.68 (± 8.68)	0.1667
KTR (µmol/mol)	41.64	42.67 (±12.29)	36.97	39.03 (± 12.20)	0.5407
5-HT (ng/ml)	1.4	3.5 (± 5.1)	2.0	7.8 (± 16.5)	0.4479

anti-CCP: anticorpo contra peptídeo cíclico citrulinado; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor.

Como todos os indivíduos que apresentavam teste positivo para anti-CCP também eram positivos para FR, não houve associação estatisticamente significativa entre ter anticorpos positivos e apresentar níveis plasmáticos alterados dos metabólitos do Trp e da KTR (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 – Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR quanto à positividade para FR e anti-CCP

Variáveis	Ausência FR + Anti-CCP (n=8)		Presença FR + Anti-CCP (n=8)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	2.65	2.8 (±1.05)	2.1	2.16 (± 0.45)	0.1506
Trp (µmol/L)	63.75	64.51 (± 5.3)	60.85	61.25 (± 9.09)	0.3995
KTR (µmol/mol)	41.64	42.67 (±12.29)	35.01	35.39 (± 6.07)	0.1644
5-HT (ng/ml)	1.0	4.0 (± 5.0)	2.0	8.0 (± 17.0)	0.4756

FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpo contra peptídeo cíclico citrulinado; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: triptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor

4.1.5 Comparação do perfil de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à presença de tabagismo

Quando testado o tabagismo como fator de influência no perfil de metabólitos do Trp e na atividade da IDO1 (KTR), foi visto que pacientes tabagistas apresentavam menores valores para todos os parâmetros dosados, mas que apenas para a KTR e para o nível de Kyn esses menores valores mostraram diferença estatisticamente significativa ($p = 0.03$) (Tabela 4.10).

Tabela 4.10.– Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, segregados em tabagistas e não-tabagistas

Variáveis	Não tabagista (n=11)		Tabagista (n=7)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	

Continua

Continuação

Variáveis	Não tabagista (n=11)		Tabagista (n=7)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (μmol/L)	2.7	2.8 (± 0.96)	2.0	2.07 (± 0.37)	0.0393
Trp (μmol/L)	61.2	62.33 (± 6.84)	63.2	61.02 (± 9.16)	0.7523
KTR (μmol/mol)	40.56	44.83 (±13.45)	33.06	34.08 (± 5.03)	0.0322
5-HT (ng/ml)	2.4	8.4 (± 15.9)	1.2	2.0 (± 2.1)	0.22

DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor.

4.1.6 Comparação do perfil de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à presença do SE

Não houve associação entre a presença do SE, dos níveis de KTR e dos metabólitos do Trp (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 – Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à presença do SE

Variáveis	SE ausente (n=8)		SE presente (n= 8)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (μmol/L)	2.45	2.58 (± 1.13)	2.45	2.56 (± 0.67)	0.9581
Trp (μmol/L)	63.3	62.2 (± 7.24)	61.7	62.7 (± 8.77)	0.9006
KTR (μmol/mol)	38.2	40.58 (±12.85)	38.04	41.64 (± 13.44)	0.8738
5-HT (ng/ml)	1.0	3.1 (± 5.2)	2.6	3.1 (± 2.2)	0.99

SE: epítipo compartilhado; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor

4.1.7 Comparação do perfil de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto ao grau de atividade inflamatória (DAS28)

Para avaliar associação entre o grau de atividade inflamatória pelo DAS-28 PCR e os metabólitos do Trp estudados, inicialmente foram formados grupos de pacientes em remissão e baixa atividade, e pacientes em moderada e alta atividade inflamatória (Tabela 4.12); depois, foram formados grupos em remissão e não-remissão (Tabela 4.13). Em nenhuma das análises, conclui-se, foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre o grau de atividade inflamatória e os níveis plasmáticos dos metabólitos.

Tabela 4.12 – Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à doença em remissão e baixa atividade, e em moderada e alta atividade

Variáveis	DAS28 < 2,6 + 2,6 < DAS28 < 3,2 (n = 9)		3,2 < DAS28 < 5,1 + DAS28 > 5,1 (n = 9)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	2.2	2.27 (± 0.47)	2.7	2.76 (± 1.09)	0.2484
Trp (µmol/L)	63.4	62.61 (± 5.07)	60.5	61.04 (± 9.75)	0.6768
KTR (µmol/mol)	36.9	36.19 (± 5.66)	42.7	45.1 (± 15.17)	0.1296
5-HT (ng/ml)	3.6	9.91 (± 17.4)	1.2	1.9 (± 1.7)	0.2106

DAS28: escore de atividade da doença; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor

Tabela 4.13 – Comparação entre os perfis de KTR e os metabólitos do Trp, em indivíduos com AR com doença em remissão e em não remissão

Variáveis	DAS28 < 2,6 (n = 5)		DAS28 ≥ 2,6 (n = 13)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	1.9	2.26 (± 0.62)	2.3	2.62 (± 0.93)	0.3621
Trp (µmol/L)	63.4	63.04 (± 3.78)	60.5	61.36 (± 8.71)	0.5779
KTR (µmol/mol)	30.5	35.53 (± 7.89)	37.85	42.62 (± 12.99)	0.1858
5-HT (ng/ml)	3.6	5.0 (± 6.06)	1.4	6.3 (± 14.6)	0.5028

DAS28: escore de atividade da doença; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor.

4.1.8 Análise do perfil de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos com AR, quanto à terapia com MMCDs

Quanto ao uso de MMCDs, os indivíduos de AR dessa etapa do estudo foram distribuídos a partir dos seguintes critérios: dois (11.1%) eram virgens de tratamento, cinco (27.8%) estavam em uso de MMCD sintéticos e 11 (61.1%) em uso da combinação de MMCD biológico com MMCD sintético. No grupo de pacientes sem tratamento específico para AR (n=2), 100% eram do sexo feminino, 50% tabagistas, percebendo-se que apresentavam DAS-28 PCR de 5.59, médias de AD de 6, AE de 3.5, EVA de 100 mm e PCR 4.07 mg/dl. Já os pacientes em terapia com MMCDs (n=11), 87.5% eram do sexo feminino, 37.5% tabagistas, 42.8% carreadores do SE, 43.75% apresentavam FR positivo e 50% anti-CCP positivo e um baixo grau de atividade inflamatória, com DAS-28 PCR de 2.92, médias de PCR 0.47 mg/dl, AD de 2.43, AE de 1.31 e EVA de 42.8.

A tabela 4.14 mostra a comparação entre os níveis plasmáticos médios de Trp de pacientes sem tratamento com MMCD e os níveis de pacientes em tratamento. Observam-se níveis de Trp reduzidos no grupo sem tratamento, quando comparado ao grupo em tratamento com MMCD (p=0.0016).

Tabela 4.14 – Comparação entre os perfis de metabólitos do Trp e KTR em indivíduos com AR, quanto à presença ou à ausência de tratamento com MMCD

Variáveis	Sem MMCD (n= 2)		Com MMCD (n = 16)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	2.8	2.8 (± 1.27)	2.25	2.48 (± 0.84)	0.7925
Trp (µmol/L)	51.4	51.4 (± 1.76)	62.7	63.1 (± 6.99)	0.0016
KTR (µmol/mol)	54.0	54.0 (± 22.87)	36.9	38.9 (± 10.1)	0.5269
5-HT (ng/ml)	1.4	1.4 (± 0.28)	2.0	6.5 (± 13.37)	0.6405*

MMCD: medicação modificadora do curso da doença; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: triptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

* teste não-paramétrico Mann-Whitney

Fonte: o autor

Quando selecionados os indivíduos em tratamento com MMCDs, e divididos em dois grupos, um com uso de MMCDs sintéticos e um com MMCDs sintéticos combinados a biológicos, não foi vista diferença estatisticamente significativa entre os perfis de KTR e de metabólitos nos dois grupos (tabela 4.15).

Tabela 4.15 – Comparação entre os perfis de KTR e metabólitos do Trp em indivíduos com AR segregados quanto ao tipo de MMCD utilizado

Variáveis	MMCDs (n=5)		MMCDs + MMCDb (n=11)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	2.30	2.36 (± 0.28)	2.2	2.54 (± 1.01)	0.5865
Trp (µmol/L)	64.1	64.3 (± 7.89)	61.2	62.5 (± 6.87)	0.6762
KTR (µmol/mol)	36.9	36.9 (± 5.32)	36.9	39.8 (± 11.7)	0.5105
5-HT (ng/ml)	4.4	13.3 (± 23.17)	1.4	3.42 (± 4.45)	0.3970

MMCDs: medicação modificadora do curso da doença sintética; MMCDb: medicação modificadora do curso da doença biológica; DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: triptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor.

4.1.9 Comparação entre os parâmetros de metabólitos do Trp e da KTR em indivíduos que apresentam ou não o alelo mutado dos SNPs da IDO1 estudados

Os únicos SNPs que apresentaram genótipos com e sem a presença do alelo mutado foram os rs7820268, rs3739319 e rs9298586. Para estes, não foi vista associação entre a presença do alelo mutado e a diferença nos níveis de KTR e dos metabólitos do Trp. Para os SNPs rs61753677, rs35099072 e rs35059413, as análises não foram possíveis em razão da ausência de genótipo com o alelo mutado.

Tabela 4.16 Comparação entre os perfis dos metabólitos do Trp e da KTR entre indivíduos com e sem o alelo mutado para o SNP rs7820268

Variáveis	Sem alelo mutado (CC) (n= 6)		Com alelo mutado (CT) (n = 11)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	

Continua

Continuação

Variáveis	Sem alelo mutado (CC)		Com alelo mutado (CT)		p-valor
	(n= 6)		(n = 11)		
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	3.05	3.11 (± 1.20)	2.20	2.22 (± 0.45)	0.1426
Trp (µmol/L)	61.7	61.6 (± 9.36)	63.2	62.1 (± 7.30)	0.9015
KTR (µmol/mol)	47.2	50.1 (± 15.8)	35.8	35.8 (± 6.1)	0.0877
5-HT (ng/ml)	1.5	2.03 (± 1.24)	1.6	8.4 (± 15.9)	0.2180

DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor

Tabela 4.17 Comparação entre os perfis dos metabólitos do Trp e da KTR entre indivíduos carreadores e não carreadores do alelo mutado para o SNP rs3739319

Variáveis	Sem alelo mutado (GG)		Com alelo mutado (AG+AA)		p-valor
	(n= 10)		(n = 7)		
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	2.65	2.52 (± 0.68)	2.0	2.57 (± 1.16)	0.9193
Trp (µmol/L)	63.3	61.43 (± 6.52)	60.5	62.7 (± 9.86)	0.7675
KTR (µmol/mol)	39.4	41.1 (± 12.17)	36.9	40.4 (± 13.5)	0.9065
5-HT (ng/ml)	1.5	3.6 (± 4.7)	1.6	9.8 (± 19.8)	0.4481

DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

Fonte: o autor

Tabela 4.18 Comparação entre os perfis dos metabólitos do Trp e da KTR entre indivíduos carreadores e não carreadores do alelo mutado para o SNP rs9298586

Variáveis	Sem alelo mutado (TT)		Com alelo mutado (GT)		p-valor
	(n= 13)		(n = 4)		
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Kyn (µmol/L)	2.65	2.52 (± 0.68)	2.0	2.57 (± 1.16)	0.9193

Continua

Continuação

Variáveis	Sem alelo mutado (TT) (n= 13)		Com alelo mutado (GT) (n = 4)		p-valor
	mediana	média (± DP)	mediana	média (± DP)	
Trp (µmol/L)	63.3	61.43 (± 6.52)	60.5	62.7 (± 9.86)	0.7675
KTR (µmol/mol)	39.4	41.1 (± 12.17)	36.9	40.4 (± 13.5)	0.9065
5-HT (ng/ml)	1.6	7.06 (± 14.8)	2.8	3.2 (± 2.9)	0.9563*

DP: desvio padrão; Kyn: quinurenina; Trp: trptofano; KTR: relação Kyn/Trp; 5-HT: serotonina

* teste não-paramétrico Mann-Whitney

Fonte: o autor

4.2 Estudo genético

Nessa etapa, o grupo de AR foi composto por 328 indivíduos, sendo 157 (48%) provenientes de Porto Alegre e 171 (52%) de Ribeirão Preto; já o de controles saudáveis foi constituído por 234 indivíduos, sendo 121 (51.7%) de Ribeirão Preto e 113 (48.3%) de Porto Alegre.

4.2.1 Análise descritiva dos dados demográficos e clínicos

A caracterização dos indivíduos de AR quanto a aspectos demográficos, soropositividade para autoanticorpos e presença de SE e tabagismo encontra-se na tabela 4.19.

Tabela 4.19 Caracterização dos indivíduos de AR procedentes de Ribeirão Preto e de Porto Alegre segundo características demográficas e fatores prognósticos

Variáveis	Total (n= 328)		Ribeirão Preto (n= 171)		Porto Alegre (n= 157)	
	n*	%	n*	%	n*	%

Continua

Faixa etária

18-59 anos	192	58,5	118	69	74	47
> 60 anos	136	41,5	53	31	83	53

Sexo

Feminino	274	84	152	89	122	78
Masculino	54	16	19	11	35	22

Etnia

Caucasiana	242	74	92	54	150	95
Não caucasiana	86	26	79	46	7	5

Tempo de sintomas

1,5 a 12 meses	17	5	17	10	0	0
12,1 a 60 meses	72	22	72	43	0	0
> 60 meses	237	73	80	47	157	100

Tabagismo

Presente	159	48,5	79	46	80	51
Ausente	169	51,5	92	54	77	49

SE

Presente	196	63	106	64	90	62
Ausente	115	37	59	36	56	38

Fator reumatoide

Presente	269	82	136	79	133	85
Ausente	59	18	35	21	24	15

Anti-CCP

Presente	177	81	132	77	45	94
Ausente	42	19	39	23	3	6

* número de indivíduos com dados disponíveis; SE: epítipo compartilhado; anti-CCP: anticorpo contra o peptídeo cíclico citrulinado

Fonte: o autor

Para a amostra total (n=328), a faixa etária de 18 a 59 anos foi a mais prevalente (58,5%), apesar da amostra de Porto Alegre estar predominantemente na faixa etária maior que 60 anos (53%). A maioria dos indivíduos era do sexo feminino (84%), etnia caucasiana (74%) e apresentava SE (63%), FR (82%) e anti-CCP (81%). O tabagismo estava presente em 49% dos casos. O tempo de duração dos sintomas foi maior que 60 meses em 73% dos indivíduos, influenciado pela amostra de Porto Alegre, já que a amostra de Ribeirão Preto apresentou tempo de duração dos sintomas predominantemente menor que 60 meses (53%).

A caracterização quanto a aspectos de atividade inflamatória da AR para o grupo de Ribeirão Preto (n=171) é apresentada na tabela 4.20.

Tabela 4.20 – Caracterização clínico-laboratorial do grupo AR de Ribeirão Preto

Variável	n*	Média (± DP)	Mínimo	Máximo	95% IC**
Idade (anos)	171	53 (± 12)	25	85	51- 55
Sintomas (meses)	169	63 (± 40)	1.5	199	57-69
Positividade e valor do FR (UI/ml)	136/171	437 (± 854)	12.8	8380	293.4-580.5
Positividade e valor do Anti-CCP (UI/ml)	132/171	208 (± 113)	21	916	188.7- 227.2
nº. AD	170	4 (± 6)	0	28	3 - 5
nº. AE	170	3 (± 5)	0	24	2 - 4
EVA (0-100 mm)	170	40 (± 29)	0	100	35 - 44
VHS (mm/1ºh)	164	19 (± 15)	2	93	17 - 22
PCR (mg/dl)	158	1.6 (± 2.4)	0.0	19.9	1.2 - 2.0
DAS-28	160	3.1 (± 1.6)	1.0	7.9	3.1 - 3.6

Continua

Continuação

Variável	n*	Média (± DP)	Mínimo	Máximo	95% IC**
HAQ	134	0.8 (± 0.9)	0.0	3.0	0.7 - 1.0

* número de indivíduos com dados disponíveis; ** IC da média.

FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpo contra o peptídeo cíclico citrulinado; n°.AD: número de articulações dolorosas; n°. AE: número de articulações edemaciadas; EVA: escala visual analógica; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C reativa; DAS28 PCR: escore de atividade da doença baseado em 28 articulações; HAQ: *Health Assessment Questionnaire*.

Fonte: o autor.

Nesse grupo, o tempo médio de duração da doença foi de 63 meses, com desvio padrão de 40 meses (IC 95% 56 a 69). Tabagismo estava presente em 46%, SE em 64%, FR em 79% e anti-CCP em 77% dos indivíduos. Os valores médios dos anticorpos dentre os exames positivos foram de 437 UI/ml para o FR e de 208 IU/ml para o anti-CCP. Quanto aos aspectos de atividade da doença, a média de articulações dolorosas (AD) foi de 4 e edemaciadas (AE), 3; a EVA variou em um intervalo de 35mm a 44mm, sendo a média de 40 mm; já o valor médio da VHS foi de 19 mm/1ª hora (IC 95% 17 a 22) e de PCR, 1.6 mg/dl (IC 95% 1.2 a 2); as médias de DAS 28 VHS foram de 3.5 (IC 95% 3.3 a 3.8) e DAS 28 PCR de 3.4 (IC 95% 3.1 a 3.6). A variável HAQ foi avaliada em 78% dos indivíduos, com média de 0.8. Quanto à terapia para AR, utilizada nesse subgrupo, 106 (76.2%) portadores de AR estavam em uso de prednisona 5mg/dia, estando 58 (41.7%) em combinação com um MMCD sintético, 15 (10.8%) com dois MMCDs sintéticos e 55 (39.6%) com um MMCD sintético e um biológico (39.6%). Apenas 11 (7.9%) pacientes estavam sem usar MMCDs e 33 (23.8%) estavam sem corticóide. Na tabela 4.21, há descrição dos dados disponíveis da amostra de AR de Porto Alegre (n=157).

Tabela 4.21 - Parâmetros clínicos e laboratoriais do grupo AR de Porto Alegre

Variáveis	n*	Média (± DP)	Mínimo	Máximo	95% IC**
-----------	----	-----------------	--------	--------	----------

Continua

Continuação

Idade (anos)	157	59 ($\pm$ 13)	25	89	57 - 61
Sintomas (meses)	157	237 ($\pm$ 95)	72	504	222-252
Positividade e valor do FR (UI/ml)	133	528 ($\pm$ 915)	15	5370	373 - 684
Positividade e valor do anti-ccp (UI/ml)	45	171 ($\pm$ 109)	21	341	138 - 204

* número de indivíduos com dados disponíveis; ** intervalo de confiança da média.

FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpo contra o peptídeo cíclico citrulinado

Fonte: o autor

A média de idade foi de 59 anos, com desvio padrão de 13 anos. A duração média dos sintomas foi de 237 meses, com desvio padrão de 95 meses, sendo 52% dos indivíduos tabagistas e 62% dos carregadores do SE. Todos os indivíduos desse grupo realizaram a quantificação do FR, sendo que 84,7% dos indivíduos apresentaram teste positivo e valor médio de 528 UI/ml (IC 95% 373 a 684). Já a pesquisa do anti-CCP foi realizada apenas em 47 indivíduos (29,9%), sendo positivo em 89,3% dos casos, com título médio de 171 U/ml (IC 95% 138 a 204). Os dados referentes à atividade da doença não estavam disponíveis para descrição.

A partir dos dados individualizados para amostras de AR de Ribeirão Preto (tabela 4.20) e de Porto Alegre (tabela 4.21), a amostra total (n=328) teve média de idade de 56 anos, com desvio padrão de $\pm$ 13 e duração dos sintomas de 150 meses, com desvio padrão de $\pm$ 113.

Os grupos de AR foram pareados aos seus respectivos grupos controles quanto aos fatores de idade, sexo, etnia e presença de tabagismo (tabelas 4.22, 4.23 e 4.24).

Tabela 4.22 - Caracterização dos grupos AR e controles saudáveis segundo características demográficas e presença de tabagismo em Ribeirão Preto

Variável	Grupo AR (n=171)	Grupo Controle (n=121)	valor p
-----------------	-----------------------------	-------------------------------	----------------

Continua

Continuação

Variável	Grupo AR (n=171)	Grupo Controle (n=121)	valor p
Idade, anos (média, $\pm$ DP)	53 $\pm$ 12	48 $\pm$ 13	0.0008
Sexo feminino (n,%)	152 (88.9)	86 (71.1)	0.0002
Caucasianos (n,%)	92 (53.8)	72 (59.5)	0.3420
Tabagismo (n,%)	79 (46.2)	30 (24.8)	0.0002
DP: desvio padrão			

Fonte: o autor.

Tabela 4.23 – Caracterização dos grupos AR e controles saudáveis segundo características demográficas e presença de tabagismo em Porto Alegre

Variável	Grupo AR (n=157)	Grupo Controle (n=113)	valor-p
Idade, anos (média, $\pm$ DP)	59 $\pm$ 13	44 $\pm$ 9	< 0.0001
Sexo feminino (n,%)	122 (77.7)	22 (19.5)	< 0.0001
Caucasianos (n,%)	150 (95.5)	113 (100)	0.0439
Tabagismo (n,%)	80 (50.9)	NA	NA
DP: desvio padrão; NA= não se aplica'			

Fonte: o autor.

Tabela 4.24 - Caracterização dos grupos AR e controles saudáveis segundo características demográficas e presença de tabagismo em ambas cidades

Variável	Grupo AR (n=328)	Grupo Controle (n=234)	valor p
Idade, anos (média, $\pm$ DP)	56 $\pm$ 13	46 $\pm$ 11	< 0.0001
Sexo feminino (n,%)	274 (83.5%)	108 (46.1)	< 0.0001
Caucasianos (n,%)	242 (73.8)	185 (79.1)	0.1615
Tabagismo (n,%)	159 (48.5%)	NA	NA
DP: desvio padrão; NA= não se aplica			

Fonte: o autor

Em todas as cidades em que foram analisadas as variáveis sexo, idade e tabagismo, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AR e controle ($p < 0.05$), sendo a média de idade sempre maior no grupo AR que no seu respectivo controle. Quanto à etnia, não houve diferença entre os grupos (p -valores 0.2052, 0.0706, e 0.0782).

4.2.2 Associação entre presença de tabagismo e SE e positividade para FR e anti-CCP

Para melhor discriminação da frequência de positividade do FR e de anti-CCP, e de acordo com a presença ou ausência do tabagismo e do SE, os dados da amostra total ($n=328$) foram divididos em tabelas individualizadas para cada cidade, uma vez que na amostra de Porto Alegre apenas 46 indivíduos (29.3%) tinham realizado a dosagem do anti-CCP, enquanto 100% dos indivíduos de Ribeirão Preto realizaram testes para os dois anticorpos.

Na amostra de Ribeirão Preto, 46.2% dos indivíduos eram tabagistas e 63.6% apresentavam alelo do SE; em ambos, a frequência de FR e anti-CCP positivos foi superior a 80% nos indivíduos (tabelas 4.25 e 4.26).

Tabela 4.25 - Análise de exposição a tabagismo e presença do epitopo compartilhado (SE) e risco de positividade para fator reumatoide (FR) em indivíduos de AR de Ribeirão Preto ($n=171$)

Variáveis	Categoria n (%)	FR positivo n (%)	FR negativo n (%)	OR	IC 95%	valor p
Tabagismo	Presente 79 (46.2)	71 (89.9)	8 (10.1)	3.69	1.56 - 8.69	0.0022
	Ausente 92 (53.8)	65 (70.6)	27 (29.4)			
SE	Presente 105 (63.6)	94 (89.5)	11 (10.5)	4.95	2.18 - 11.19	<0.0001
	Ausente 60 (36.4)	38 (63.3)	22 (36.7)			

OR; *odds ratio*, IC: intervalo de confiança.

Fonte: o autor.

Tabela 4.26 - Análise de exposição ao tabagismo e à presença do epítipo do compartilhado (SE) e risco de positividade para anti-CCP em indivíduos de AR de Ribeirão Preto (n=171)

Variáveis	Categoria n (%)	anti-CCP positivo n (%)	anti-CCP negativo n (%)	OR	IC 95%	Valor-p
Tabagismo	Presente 79 (46.2)	66 (83.5)	13 (16.5)	1.92	0.90 - 4.08	0.0986
	Ausente 92 (53.8)	66 (71.8)	25 (27.2)			
SE	Presente 105 (63.6)	92 (87.6)	13 (12.4)	5.05	2.32-10.97	<0.0001
	Ausente 60 (36.4)	35 (58.4)	25 (41.6)			

anti-CCP: anticorpo contra peptídeo cíclico citrulinado, OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

Fonte: o autor

Para os indivíduos de Porto Alegre, predominaram as presenças de tabagismo (51.6%) e de SE (62.1%). Já com 98.7% dos indivíduos que realizaram a dosagem do FR, o resultado foi positivo em 90% dos pacientes tabagistas e em 87.8% dos carreadores do SE. A avaliação da frequência do anti-CCP só foi realizada em uma minoria dos indivíduos, já que 70.7% não realizaram o teste. A partir dos pacientes que o realizaram, observou-se que resultado positivo foi mais prevalente em pacientes não tabagistas (33.4%) e sem alelo do SE (34.5%) (tabelas 4.27 e 4.28).

Tabela 4.27 - Análise de exposição a tabagismo e presença do epítipo compartilhado (SE) e risco de positividade para fator reumatoide (FR) em indivíduos de AR de Porto Alegre (n=157)

Variáveis	Categoria n (%)	FR positivo n (%)	FR negativo n (%)	OR	IC 95%	Valor-p
Tabagismo	Presente 80 (51.6)	72 (90)	8 (10)	2.64	1.06 - 6.55	0.0479
	Ausente 75 (48.4)	58 (77.3)	17 (22.7)			

Continua

Continuação

	Presente	79 (87.8)	11 (12.2)			
	90 (62.1)					
SE	Ausente	42 (76.4)	13 (23.6)	2.22	0.92 - 5.39	0.1056
	55 (37.9)					

OR; *odds ratio*, IC: intervalo de confiança.

Fonte: o autor

Tabela 4.28 Análise de exposição a tabagismo e presença do epítipo compartilhado (SE) e risco de positividade para anti-CCP em indivíduos de AR de Porto Alegre (n= 157)

Variáveis	Categoria n (%)	anti-CCP positivo n (%)	anti-CCP negativo n (%)	OR	IC 95%	valor p
Tabagismo	Presente 80 (51.6)	17 (21.2)	2 (2.5)	0.68	0.08 - 5.30	1.0000
	Ausente 75 (48.4)	25 (33.4)	2 (2.7)			
SE	Presente 90 (62.1)	22 (24.4)	1 (1.1)	3.47	0.33 -36.26	0.3463
	Ausente 55 (37.9)	19 (34.5)	3 (5.4)			

anti-CCP: anticorpo contra peptídeo cíclico citrulinado, OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

Fonte: o autor

Quando analisada a amostra total (n=328), foi observada a prevalência de positividade de FR e de anti-CCP entre tabagistas e carreadores do SE (tabelas 4.29 e 4.30).

Tabela 4.29 - Análise de exposição ao tabagismo e à presença do epítipo compartilhado (SE), e o risco de positividade para fator reumatoide (FR) em indivíduos de AR em ambas as cidades (n= 328)

Variáveis	Categoria n (%)	FR positivo n (%)	FR negativo n (%)	OR	IC 95%	valor p
Tabagismo	Presente 159 (48.8)	143 (89.9)	16 (10.1)	3.19	1.71 - 5.94	0.0002
	Ausente 167 (51.2)	123 (73.6)	44 (26.4)			
SE	Presente 195 (62.9)	173 (88.7)	22 (11.3)	3.44	1.89 - 6.24	<0.0001
	Ausente 115 (37.1)	80 (69.6)	35 (30.4)			

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

Fonte: o autor

Tabela 4.30 - Análise de exposição a tabagismo e à presença do epítipo compartilhado (SE), e o risco de positividade para anti-CCP em indivíduos de AR ambas as cidades (n= 328)

Variáveis	Categoria n (%)	anti-CCP positivo n (%)	anti-CCP negativo n (%)	OR	IC 95%	valor p
Tabagismo	Presente 159 (48.7)	83 (52.2)	15 (9.4)	3.19	1.71 - 5.94	0.0002
	Ausente 167 (51.3)	91 (54.5)	28 (16.8)			
SE	Presente 195 (62.9)	114 (58.5)	14 (7.2)	4.22	2.05 - 8.66	<0.0001
	Ausente 115 (37.1)	54 (46.9)	28 (24.3)			

anti-CCP: anticorpo contra peptídeo cíclico citrulinado, OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

Fonte: o autor

Assim, a presença do tabagismo foi associada ao FR positivo em todos os grupos de AR ($p < 0,05$), mas o mesmo não ocorreu com a presença do anti-CCP. Já a presença do SE foi associada à positividade de FR e de anti-CCP, tanto nas amostras de Ribeirão Preto (respectivamente, $p < 0.0001$; OR 4.95; IC 95% 2,18 a 11,19 e $p < 0.0001$; OR 5.05; IC 95% 2,32 a 10,97) como nas amostras de ambas as cidades (respectivamente, $p < 0.0001$; OR 3.44; IC 95% 1,89 a 6,24 e $p < 0.0001$; OR 4.22; 2,05 a 8,66, respectivamente). Na amostra de Porto Alegre, essa associação não foi estatisticamente significativa, nem para FR, nem para anti-CCP.

Quando os pacientes foram subdivididos em combinações quanto à presença ou à ausência de tabagismo e/ou SE, e quando foram avaliados quanto à soropositividade para os anticorpos (tabela 4.31), houve associação estatisticamente significativa, tanto para presença de FR como para a de anti-CCP nos indivíduos tabagistas e carreadores do SE nas amostras de Ribeirão Preto ($p < 0.0001$; OR 10.08; IC 2.31 - 43.9 e $p = 0.01$; OR 3.24; IC 1.26 - 8.32, respectivamente) e nas amostras das duas cidades ($p < 0.0001$; OR 4.62; IC 2.01 - 10.06 e $p = 0.03$; OR 2.59; IC 1.08 - 6.20, respectivamente). Indivíduos não tabagistas e não carreadores do SE foram associados com soronegatividade para FR ($p < 0.0001$; OR 0.21; IC 0.12 - 0.40) e para anti-CCP ($p < 0.0001$; OR 0.23; IC 0.11 - 0.47) quando avaliada a amostra total.

Tabela 4.31 - Relação entre exposição a tabagismo, presença do epítipo compartilhado(SE) e risco de apresentar FR ou anti-CCP positivos

Amostra de Ribeirão Preto								
	FR positivo (n=132)	FR negativo (n=33)	OR IC 95%	p-valor	AntiCCP positivo (n= 127)	Anti-CCP negativo (n= 38)	OR IC 95%	p-valor
SE+/TBG+	52	2	10.08 (2.31-43.91)	<0.0001	48	6	3.24 (1.26-8.32)	0.01
SE+/TBG-	42	9	1.14 (0.48-2.69)	0.83	44	7	2.35 (0.96-5.77)	0.07
SE-/TBG+	17	5	0.83 (0.28-2.43)	0.78	16	6	0.77 (0.28-2.13)	0.6
SE-/TBG-	21	17	0.18 (0.07-0.40)	<0.0001	19	19	0.18 (0.08-0.39)	<0.0001
Amostra de Porto Alegre								
	FR positivo (n=109)	FR negativo (n=15)	OR IC 95%	p-valor	AntiCCP positivo (n=40)	Anti-CCP negativo (n= 4)	OR IC 95%	p-valor
SE+/TBG+	47	5	1.52 (0.48-4.73)	0.58	9	1	0.87 (0.08-9.43)	1.0000
SE+/TBG-	31	6	0.59 (0.19-1.81)	0.38	12	0	3.94 (0.19-79.1)	0.56
SE-/TBG+	19	2	1.37 (0.28-6.59)	1.00	7	1	0.63 (0.06-7.06)	0.57
SE-/TBG-	23	11	0.09 (0.03-0.33)	0.0001	12	2	0.43 (0.05-3.40)	0.59
Amostra total								
	FR positivo (n=252)	FR negativo (n=57)	OR IC 95%	p-valor*	AntiCCP positivo (n= 167)	Anti-CCP negativo (n=42)	OR IC 95%	p-valor
SE+/TBG+	99	7	4.62 (2.01-10.6)	<0.0001	57	7	2.59 (1.08-6.20)	0.03
SE+/TBG-	73	15	1.14 (0.59-2.18)	0.74	56	7	2.52 (1.05-6.04)	0.03
SE-/TBG+	36	7	1.19 (0.50-2.83)	0.83	23	7	0.80 (0.32-2.01)	0.62
SE-/TBG-	44	28	0.21 (0.12-0.40)	<0.0001	31	21	0.23 (0.11-0.47)	<0.0001

FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpo contra peptídeo cíclico citrulinado; SE +: epítipo compartilhado presente; SE -: epítipo compartilhado ausente; TBG +: presença de tabagismo; TBG -: ausência de tabagismo; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

Fonte: o autor

4.2.3 Discriminação alélica individual

A figura 14 ilustra o resultado individual da reação de RT-PCR de um indivíduo heterozigoto para um dos polimorfismos estudados:

Figura 14 –Discriminação alélica do genótipo heterozigoto CT para o rs7820268

Fonte: o autor.

No gráfico acima, a linha verde representa a sonda marcada por VIC e corresponde ao alelo C, e a linha azul, a sonda marcada por FAM e corresponde ao alelo T. A curva ROX em vermelho normaliza a reação em relação à fluorescência.

A figura 15, por sua vez, exemplifica o resultado de uma das análises de discriminação alélica – no caso, o rs 7820268 –, em que há a representação bem definida dos três clusters formados: genótipo homozigoto selvagem, genótipo homozigoto mutado e heterozigoto.

Figura 15 - Representação dos *clusters* do rs7820268.

Os genótipos homozigoto TT (em azul), heterozigoto CT (em vermelho) e homozigoto CC (em verde).

Fonte: o autor.

4.2.4 Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos do gene IDO1

As frequências alélicas dos polimorfismos selecionados para análise estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 4.32 - Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos do gene da IDO1 selecionados nas amostras de Ribeirão Preto e Porto Alegre

SNP	Alelo	Grupo AR (n= 320) n (%)	Grupo Controle (n= 232) n (%)
rs7820268	C	471 (73.6)	329 (71.2)
	T	169 (26.4)	133 (28.8)
rs3739319	G	434 (67.8)	301 (65)
	A	206 (32.2)	163 (35)
rs9298586	T	600 (93.7)	442 (95.6)
	G	40 (6.3)	22 (4.4)
rs61753677	C	633 (98.9)	459 (98.9)
	T	7 (1.1)	5 (1.1)
rs35099072	G	640 (100)	460 (100)
	A	0	0
rs35059413	G	636 (99.1)	461 (99.4)
	A	6 (0.9)	3 (0.6)
IDO1= indoleamine 2,3-dioxigenase 1			

Fonte: o autor.

4.2.5 A distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos do gene IDO1 e o equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências genotípicas dos polimorfismos estudados nas amostras de indivíduos de AR e de controles saudáveis, para cada cidade, encontram-se nos anexos. As frequências genotípicas dos polimorfismos estudados para a amostra de indivíduos de ambas as cidades dos grupos de AR e de controles saudáveis são

apresentadas na tabela 4.33. Todos os polimorfismos estavam em consonância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4.33 - Distribuição das frequências genotípicas esperadas e observadas dos polimorfismos no gene da população com AR e dos indivíduos controles no grupo formado pelas amostras de Porto Alegre e de Ribeirão Preto

SNP	Genótipo	Grupo AR (N = 320**)			Grupo Controle (N = 232***)		
		Frequência esperada n (%)	Frequência observada n (%)	valor p	Frequência esperada n (%)	Frequência observada n (%)	valor p
rs 7820268	CC*	173 (54.3)	175 (54.9)	0.92	117 (50.7)	116 (50.2)	0.97
	CT	124 (38.8)	120 (37.6)		95 (41)	97 (42)	
	TT	22 (6.9)	24 (7.5)		19 (8.3)	18 (7.8)	
rs 3739319	GG*	147 (45.9)	147 (45.9)	1.00	97 (42)	100 (43.1)	0.89
	AG	140 (43.7)	140 (43.7)		106 (45.6)	101 (43.5)	
	AA	33 (10.4)	33 (10.4%)		29 (12.4)	31 (13.4)	
rs 9298586	TT*	281 (87.9)	281 (87.8)	1.00	210 (90.6)	214 (92.2)	0.20
	GT	38 (11.7)	38 (11.9)		21 (9.1)	14 (6)	
	GG	1 (0.4)	1 (0.3)		1 (0.2)	4 (1.8)	
rs 61753677	CC*	313 (97.8)	313 (97.8)	1.00	227 (97.91)	228 (98.3)	0.47
	CT	7 (2.18)	7 (2.2)		5 (2.08)	3 (1.3)	
	TT	0 (0.02)	0 (0)		0 (0.01)	1 (0.4)	
rs 35099072	GG*	320 (100)	320 (100)	1.00	230 (100)	230 (100)	1.00
	AG	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
	AA	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
rs 35059413	GG*	315 (98.1)	315 (98.1)	1.00	229 (98.7)	230 (99.1)	0.37
	AG	6 (1.9)	6 (1.9)		3 (1.2)	1 (0.4)	
	AA	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (0.4)	

* genótipo de referência

** para os SNPs rs7820268 e rs35059413, no grupo de AR, foram obtidos n de 319 e 321, respectivamente.

*** para os SNPs rs7820268 e rs35099072, no grupo de controles, foram obtidos n de 231 e 230, respectivamente.

SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado a partir da diferença entre as frequências esperadas e observadas através do teste χ^2 . A frequência esperada foi calculada a partir da fórmula $p^2+2pq+q^2$, onde p^2 corresponde à frequência esperada para o genótipo homozigoto selvagem, $2pq$ a do genótipo heterozigoto e q^2 a do genótipo homozigoto mutado

Fonte: o autor

4.2.6 Associação dos polimorfismos do gene da IDO1 e com a presença de AR

Não foi observada associação individual das variáveis genéticas estudadas com a presença de AR (p-valores > 0.05). Para a variável rs35099072, não foi possível a análise pela ausência do alelo mutado e, consequentemente, de genótipos heterozigotos e homozigotos mutados.

Tabela 4.34 - Avaliação sobre a associação entre polimorfismo da IDO1 e a presença de AR na amostra total de indivíduos de Ribeirão Preto e Porto Alegre

SNP	Genótipo Alelo #	Grupo AR (n=320**)		Grupo controle (n=232**)		Valor p	OR	IC 95%
		n	%	n	%			
rs7820268	CC*	175	54.9	116	50.2	0.32	0.83	0.60 - 1.16
	CT+TT	144	45.1	115	49.8			
	alelo T	168	26.3	133	28.8	0.40	0.88	0.68 - 1.15
rs3739319	GG*	147	45.9	100	43.1	0.57	0.89	0.64 - 1.25
	AG+AA	173	54.1	132	56.9			
	alelo A	206	32.2	163	35.1	0.34	0.88	0.69 - 1.12
rs9298586	TT*	281	87.8	214	92.2	0.12	1.65	0.91 - 2.96
	GT+GG	39	12.2	18	7.8			
	alelo G	40	6.3	22	4.8	0.29	0.75	0.43 - 1.27
rs61753677	CC*	313	97.8	228	98.3	0.77	1.27	0.36 - 4.40
	CT+TT	7	2.2	4	1.7			
	alelo T	7	1.1	5	1.1	1.00	1.01	0.32 - 3.22
rs35099072	GG*	320	100	230	100	NA	NA	NA
	AG+AA	0	0	0	0	NA	NA	NA
	alelo A	0	0	0	0	NA	NA	NA
rs35059413	GG*	315	98.1	230	99.1	0.48	2.19	0.43 - 10.9
	AG+AA	6	1.9	2	0.8			
	alelo A	6	0.9	3	0.7	0.74	1.45	0.36 - 5.82

NA=não se aplicou; # alelo mutado; * genótipo homozigoto selvagem;

SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

** para os SNPs rs7820268 e rs35059413, no grupo de AR, foram obtidos n de 319 e 321, respectivamente, e para os SNPs rs7820268 e rs35099072, no grupo de controles, foram obtidos n de 231 e 230, respectivamente.

Fonte: o autor.

4.2.7 Associação dos polimorfismos do gene da IDO1 e positividade para FR e para anti- CCP

Não foram observadas associações estatisticamente significantes entre polimorfismos do gene da IDO1 e presença de FR (tabela 4.35) e de anti-CCP (tabela 4.36), já que, em todos os SNPs que foram possíveis essas análises, foram identificados valores de p superiores a 0,05.

Tabela 4.35 - Avaliação sobre a associação entre polimorfismo da IDO1 e a presença de (fator reumatoide) FR em pacientes com AR na amostra total de indivíduos de Ribeirão Preto e de Porto Alegre

SNP	Genótipo	FR positivo (n= 262*)		FR negativo (n= 58**)		valor p	OR	IC 95%
		n	%	n	%			
rs 7820268	CC*	141	54	34	58.6	0.56	1.20	0.67 - 2.14
	CT+ TT	120	46	24	41.4			
rs 3739319	GG*	119	45.5	28	48.3	0.77	1.12	0.63 - 1.98
	AG + AA	143	54.5	30	51.7			
rs 9298586	TT*	230	87.8	51	87.9	1.00	1.01	0.42 - 2.42
	GT + GG	32	12.2	7	12.1			
rs 61753677	CC*	258	98.5	55	96.3	0.11	0.28	0.06 - 1.30
	CT + TT	4	1.5	3	3.7			
rs 35099072	GG*	262	100	58	100	NA	NA	NA
	AG + AA	0	0	0	0			
rs 35059413	GG*	259	98.5	52	96.3	0.27	0.40	0.07 - 2.25
	AG + AA	4	1.5	2	3.7			

* quanto à presença do FR, os rs7820268 e rs35059413 apresentaram n de 261 e 263, respectivamente.

** quanto à ausência do FR, o rs35059413 apresentou n de 54.

IDO1: indoleamine 2,3-dioxigenase 1; SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples. OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança

Fonte: o autor.

Tabela 4.36 - Avaliação sobre a associação entre polimorfismo da IDO1 e a presença de anti-CCP, em pacientes com AR, na amostra total de indivíduos de Ribeirão Preto e de Porto Alegre

SNP	Genótipo	anti-CCP positivo (n= 174)		anti-CCP negativo (n= 42)		valor p	OR	IC 95%
		n	%	n	%			
rs 7820268	CC*	96	55.2	21	50.0	0.60	0.81	0.41 - 1.59
	CT+ TT	78	44.8	21	50.0			
rs 3739319	GG*	79	45.4	26	61.9	0.06	1.95	0.97 - 3.89
	AG + AA	95	54.6	16	38.1			

Continua

Continuação

rs 9298586	TT*	149	85.6	35	83.4	0.80	0.83	0.33 - 2.09
	GT + GG	25	14.4	7	16.6			
rs 61753677	CC*	171	98.3	39	92.8	0.08	0.22	0.04 - 1.17
	CT + TT	3	1.7	3	7.2			
rs 35099072	GG*	174	100	42	100	NA	NA	NA
	AG + AA	0	0	0	0			
rs 35059413	GG*	171	98.3	40	95.2	0.25	0.35	0.05 - 2.17
	AG + AA	3	1.7	2	4.8			

IDO1: indoleamine 2,3-dioxigenase 1; anti-CCP: anticorpo contra o peptídeo cíclico citrulinado; SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples. OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança

Fonte: o autor.

4.2.8 Associação dos polimorfismos do gene da IDO1 com a presença do epítipo compartilhado (SE)

Não foi vista associação entre o indivíduo ser portador do SE e apresentar o alelo mutado (tabela 4.37).

Tabela 4.37 - Avaliação sobre a associação entre polimorfismos da IDO1 quanto à presença do epítipo compartilhado (SE) na população com AR de Ribeirão Preto e de Porto Alegre (N = 306)

SNP	Genótipo	SE presente (n= 191*)		SE ausente (n = 115)		valor p	OR	IC 95%
		n	%	n	%			
rs 7820268	CC*	102	53.7	63	54.8	0.90	0.95	0.60 - 1.52
	CT+ TT	88	46.3	52	45.2			
rs 3739319	GG*	82	42.9	58	50.4	0.23	0.73	0.46 - 1.17
	AG + AA	109	57.1	57	49.6			
rs 9298586	TT*	170	89.0	98	85.2	0.37	1.40	0.70 - 2.78
	GT + GG	21	11.0	17	14.8			
rs 61753677	CC*	188	98.4	111	96.5	0.43	2.25	0.49 - 10.2
	CT + TT	3	1.6	4	3.5			
rs 35099072	GG*	191	100.0	115	100.0	NA	NA	NA
	AG + AA	0	0	0	0			
rs 35059413	GG*	187	97.9	113	98.3	1.00	0.82	0.14 - 4.59
	AG + AA	4	2.1	2	1.7			

IDO1: indoleamine 2,3-dioxigenase 1; SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples. OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança

* para o SNP rs7820268 com presença do SE foi obtido um n= 190

Fonte: o autor.

4.2.9 Associação entre polimorfismos do gene *IDO1* e grau de atividade da doença pelo DAS28

Os dados, quanto à atividade da doença, são referentes apenas à população de AR de Ribeirão Preto (n=171). A tabela 4.38 mostra as frequências de distribuição dos genótipos de acordo com grau de atividade inflamatória da doença, baseado no DAS-28 PCR, divididos em: remissão (DAS-28 < 2,6), baixa atividade (2,6<DAS-28<3,2), moderada atividade (3,2<DAS-28<5,1) e alta atividade (DAS-28 >5,1). A prevalência foi maior para pacientes em remissão (38,7%), seguido por aqueles com doença em moderada atividade (30,3%). A presença do alelo mutado nos polimorfismos rs7820268 e rs 3739319 foi mais frequente em indivíduos com doença em remissão (52.3% e 65.2%, respectivamente), tendo sido visto, para esse último polimorfismo, uma maior frequência também em indivíduos com alta atividade inflamatória (69.0%). Para os demais SNPs, o alelo selvagem foi o mais prevalente em todos os graus de atividade da doença.

Tabela 4.38 - Distribuição das frequências genotípicas quanto ao grau de atividade da doença (DAS28) na população com AR de Ribeirão Preto (n=168)

SNP	Genótipo	DAS28 < 2,6 (n = 65)		2,6<DAS28 <3,2 (n = 23)		3,2<DAS28 <5,1 (n = 51)		DAS28 > 5,1 (n = 29)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
rs 7820268	CC*	31	47.7	12	52.2	28	55.0	15	52.0
	CT	29	44.6	9	39.1	20	39.0	12	41.0
	TT	5	7.7	2	8.7	3	6.0	2	7.0
	CT+ TT	34	52.3	11	47.8	23	45.0	14	48.0
rs 3739319	GG*	34	52.3	8	34.8	26	51.0	9	31.0
	AG	25	38.5	13	56.5	21	41.2	16	55.2
	AA	6	9.2	2	8.7	4	7.8	4	13.8
	AG + AA	31	47.7	15	65.2	25	49.0	20	69.0
rs 9298586	TT*	54	83.1	18	78.3	43	84.3	24	82.7
	GT	11	16.9	4	17.4	8	15.7	5	17.3
	GG	0	0	1	4.3	0	0	0	0
	GT + GG	11	16.9	5	21.7	8	15.7	5	17.3
rs 61753677	CC*	62	95.4	22	95.6	49	96.1	29	100.0
	CT	3	4.6	1	4.4	2	3.9	0	0
	TT	0	0	0	0	0	0	0	0
	CT + TT	3	4.6	1	4.4	2	3.9	0	0
rs 35099072	GG*	65	100.0	23	100.0	51	100.0	29	100.0

Continua

									<i>Continuação</i>
AG		0	0	0	0	0	0	0	0
AA		0	0	0	0	0	0	0	0
AG + AA		0	0	0	0	0	0	0	0
rs 35059413	GG*	62	95.4	23	100.0	49	96.1	29	100.0
	AG	3	4.6	0	0	2	3.9	0	0
	AA	0	0	0	0	0	0	0	0
	AG + AA	3	4.6	0	0	2	3.9	0	0
SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples. OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança									

Fonte: o autor.

Para avaliar a associação entre o polimorfismo e o grau de atividade da doença, os indivíduos foram divididos em dois grupos (tabela 4.39): um formado pela união dos indivíduos com doença em remissão ou em baixa atividade inflamatória (n=88), e o outro com doença em graus de moderada ou alta atividade inflamatória (n=80). Nessa análise, não foram observadas associações estatisticamente significantes ($p > 0.05$). Também não foi identificada associação entre qualquer um dos SNPs e a doença em remissão (tabela 4.40), os indivíduos com DAS28 < 2,6 (n=65), ou, ainda, os em atividade inflamatória, e os indivíduos com DAS 28 > 2,6 (n=103), uma vez que todas as análises mostraram $p > 0.05$.

Tabela 4.39 - Avaliação sobre a associação entre os polimorfismos quanto ao grau de atividade da doença (DAS28) na população com AR de Ribeirão Preto (n = 168)

SNP	Genótipo	DAS 28 < 2,6 + 2,6 < DAS 28 < 3,2 (n = 88)		3,2 < DAS 28 < 5,1 + DAS 28 > 5,1 (n = 80)		valor p	OR	IC 95%
		n	%	n	%			
rs 7820268	CC*	43	48.9	43	53.7	0.54	0.82	0.44 - 1.50
	CT + TT	45	51.1	37	46.3			
rs 3739319	GG*	42	47.7	35	43.7	0.64	1.17	0.63 - 2.15
	AG + AA	46	52.3	45	56.3			
rs 9298586	TT*	72	81.8	67	83.7	0.83	0.87	0.39 - 1.95
	GT + GG	16	18.2	13	16.3			
rs 61753677	CC*	84	95.4	78	97.5	0.68	0.53	0.09 - 3.02
	CT + TT	4	4.6	2	2.5			
rs 35099072	GG*	88	100.0	80	100.0	NA	NA	NA
	AG + AA	0	0	0	0			
rs 35059413	GG*	85	96.6	78	97.5	1.00	0.72	0.11 - 4.46
	AG + AA	3	3.4	2	2.5			

Continua

Continuação

SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples. OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança NA= não se aplica

Fonte: o autor

Tabela 4.40 - Avaliação sobre a associação entre polimorfismos, quanto à remissão da doença, na população com AR de Ribeirão Preto (n = 168)

SNP	Genótipo	DAS28 < 2,6 (n= 65)		DAS28 ≥ 2,6 (n = 103)		valor p	OR	IC 95%
		n	%	n	%			
rs 7820268	CC*	31	47.7	55	53.4	0.52	0.79	0.42 - 1.48
	CT+ TT	34	52.3	48	46.6			
rs 3739319	GG*	34	52.3	43	41.7	0.20	1.53	0.81 - 2.85
	AG + AA	31	47.7	60	58.3			
rs 9298586	TT*	54	83.1	85	82.5	1.00	1.04	0.45 - 2.37
	GT + GG	11	16.9	18	17.5			
rs 61753677	CC*	62	95.4	100	97.1	0.67	0.62	0.12 - 3.17
	CT + TT	3	4.6	3	2.9			
rs 35099072	GG*	65	100.0	103	100.0	NA	NA	NA
	AG + AA	0	0	0	0			
rs 35059413	GG*	62	95.4	101	98.0	0.37	0.40	0.06 - 2.51
	AG + AA	3	4.6	2	2.0			

SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples. OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança NA= não se aplica

Fonte: o autor

4.2.10 - Associação entre os polimorfismos do gene *IDO1* e a resposta ao tratamento com metotrexato após três meses de início

Os indivíduos de AR da amostra de Ribeirão Preto foram avaliados quanto à associação da resposta nos primeiros três meses de tratamento com MTX e aos polimorfismos estudados (tabela 4.41). Para isso, os indivíduos foram divididos em respondedores e não-respondedores ao MTX, seguindo os critérios do EULAR de resposta ao tratamento, detalhado na seção de materiais e métodos (tabela 3.5). Com exceção do SNP rs 3739319, todos os demais SNPs apresentaram maior frequência do alelo selvagem, tanto entre respondedores como

não-respondedores, mas em nenhuma das comparações houve diferença estaticamente significativa.

Tabela 4.41 - Avaliação sobre a associação entre polimorfismos quanto à resposta ao metotrexato (MTX) nos primeiros três meses de tratamento na população com AR de Ribeirão Preto (n= 168)

SNP	Categoria	Respondedor ao MTX				valor p	OR (IC 95%)
		Sim		Não			
		n	%	n	%		
rs7820268	CC	35	51.5	45	50.6	1.00	1.03 (0.55 - 1.95)
	CT + TT	33	48.5	44	49.4		
rs3739319	GG	30	44.1	42	47.2	0.74	0.88 (0.46 - 1.66)
	AG + AA	38	55.9	47	52.8		
rs9298586	TT	57	83.8	73	82.0	0.83	1.13 (0.48 - 2.63)
	GT + GG	11	16.2	16	18.0		
rs61753677	CC	64	94.1	87	97.7	0.40	0.36 (0.06 - 2.07)
	CT + TT	4	5.9	2	2.3		
rs35099072	GG	68	100	89	100	NA	NA
	AG + AA	0	0	0	0		
rs35059413	GG	65	95.6	87	97.7	0.65	0.49 (0.08 - 3.06)
	AG + AA	3	4.4	2	2.3		

'SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples. OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; NA= não se aplica

Fonte: o autor.

4.2.11 - Comparação das variantes genéticas da IDO1 quanto à presença de tabagismo

Quanto aos parâmetros genéticos avaliados – presença do SE e polimorfismo do gene da IDO1 –, foi vista maior prevalência do SE nos indivíduos tabagistas quando comparados aos não tabagistas ($p = 0.0046$), não ocorrendo o mesmo para os SNPs do gene da IDO1. Já quanto à autoimunidade, representada pela soropositividade para FR e/ou anti-CCP, os indivíduos tabagistas apresentaram

FR positivos em maior frequência que os não tabagistas ($p=0.0002$). Não foi vista diferença estatisticamente significativa em relação ao anti-CCP.

Tabela 4.42 - Distribuição das frequências dos polimorfismos em relação ao tabagismo na população com AR de Ribeirão Preto e de Porto Alegre

SNP	Categoria	Tabagistas		Não tabagistas		valor p	OR	IC 95%
		n	%	n	%			
rs 7820268	CC*	79	51.9	96	58.2	0.31	0.77	0.49 - 1.21
	CT + TT	73	48.1	69	41.8			
rs 3739319	GG*	67	43.8	79	47.8	0.50	0.84	0.54 - 1.32
	AG + AA	86	56.2	86	52.2			
rs 9298586	TT*	135	88.2	144	87.3	0.86	1.09	0.55 - 2.14
	GT + GG	18	11.8	21	12.7			
rs 61753677	CC*	152	99.4	159	96.4	0.12	5.73	0.68 - 42.2
	CT + TT	1	0.6	6	3.6			
rs 35099072	GG*	153	100	165	100.0	NA	NA	NA
	AG + AA	0	0	0	0			
rs 35059413	GG*	152	99.4	161	97.0	0.21	4.72	0.54 - 40.9
	AG + AA	1	0.6	5	3.0			

* genótipo referência SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples. OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; NA= não se aplica

Fonte: o autor

5 DISCUSSÃO

Até o momento, não foi identificado um fator de risco isolado capaz de justificar o início e a evolução da AR, fato que a caracteriza como uma doença de etiologia multifatorial. Tal como ocorre em outras DAIs, tem sido aceito que a AR seja resultado da interação entre fatores ambientais e genéticos, modulados por fatores epigenéticos (AHMADI *et al.*, 2017) que levam à perda de tolerância imunológica, possível e preferencialmente mais por perda da tolerância periférica que por perda da tolerância central, levando em consideração a idade de início das manifestações clínicas (BOISSIER *et al.*, 2012).

O presente estudo investigou a possibilidade de associação entre o perfil dos metabólitos do Trp, a atividade da enzima IDO1 e de suas variantes genéticas, e o risco de desenvolver AR. Além disso, também foram avaliadas as possíveis influências desses metabólitos e polimorfismos nos desfechos de pior prognóstico.

A coorte de AR avaliada no estudo foi formada por adultos maiores que 18 anos, de duas cidades brasileiras, predominantemente do sexo feminino, com proporção aproximada de 5:1 na etapa de estudo do gene e de 8:1 na dos metabólitos. Essas proporções foram superiores às descritas na maioria dos estudos de AR, que são de 2:1 e 3:1 (CROSS *et al.*, 2014; ALAMANOS and Drosos, 2005). A etnia caucasiana prevaleceu na nossa amostra de AR, apesar das limitações em usar classificação fixa para etnias no Brasil, tendo em vista a grande miscigenação da nossa população.

Apesar de não existir uniformidade quanto à definição dos parâmetros prognósticos de pior desfecho na doença, fatores que favorecem persistência da atividade inflamatória, erosões e danos articulares sabidamente contribuem para uma evolução clínica desfavorável. Entre alguns desses fatores, são mencionados na literatura: grau de atividade inflamatória, presença de tabagismo, biomarcadores protéicos e alterações genéticas (ALBRECHT AND ZINK, 2017), e positividade para FR e anti-CCP, esta associada ao pior dano articular e ao aumento de mortalidade (Van GAALEN *et al.*, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2008; ALETAHA *et al.*, 2015).

Assim, quanto à avaliação de fatores de pior prognóstico, nossa amostra, em sua maioria, apresentou resultados positivos para FR (82%) e anti-CCP (81%), ambos os anticorpos com média de valores em títulos altos. Apesar de não termos dados sobre erosões e deformidades, nossa amostra teve uma média de duração de sintomas de 150 meses, mas com funcionalidade preservada (média do HAQ de 0.8), o que limita, com os nossos dados, concluir se há relação entre a positividade

para FR e o anti-CCP positivos para/com desfecho. Mesmo ao avaliarmos os portadores de AR quanto à terapia com MMCDs, percebe-se que a maioria dos indivíduos (57.1%) estava em uso de drogas sintéticas com DAS28-PCR em baixa atividade, o que corrobora a ideia de que a positividade dos anticorpos na nossa amostra não pareceu influenciar o grau de atividade inflamatória e o pior desfecho, já que a introdução de agentes biológicos é reservada para casos em que houve falha no tratamento com MMCD sintético isolado e/ou na combinação e persistência da atividade inflamatória (Figura 2).

Apesar de haver divergências sobre o tabagismo ser preditor de progressão radiográfica com pior dano articular (SAEVARSDOTTIR *et al.*, 2015; GRANGER *et al.*, 2016), é sabido que ele está associado ao desenvolvimento de AR e ao pior resposta ao tratamento (SAEVARSDOTTIR *et al.*, 2011). Quanto ao tabagismo e sua participação na AR, nosso estudo identificou forte associação quando combinados tabagismo e SE com positividade para FR e anti-CCP, o que reafirma as observações encontradas por Oliveira *et al* quando avaliaram uma coorte de 100 indivíduos em Ribeirão Preto e encontraram associação entre positividade para o anti-CCP e presença de ambos os fatores, tabagismo e SE (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Outro aspecto avaliado na nossa amostra foi a presença do SE. Os alelos *HLA-DRB1* do SE são associados a maior gravidade, manifestações extra-articulares e progressão de erosões (FIRESTEIN AND MCINNES, 2017) e, juntamente com o polimorfismo do *PTPN22*, representam os principais determinantes genéticos na patogênese da AR anti-CCP positivo (KLARESKOG *et al.*, 2006) (VAN DER HELM-VAN MIL *et al.*, 2006; PADYUKOV *et al.*, 2011). Observamos na nossa amostra uma maior frequência de anticorpos anti-CCP em pacientes carreadores de SE (58.5%), quando comparado a pacientes em que o SE estava ausente (46.9%); tal fato está em concordância com estudos prévios na população brasileira (LOUZADA-JÚNIOR *et al.*, 2008), e com os achados em populações menos miscigenadas e geneticamente mais homogêneas que a do Brasil (VAN DER HELM-VAN MIL *et al.*, 2006; PADYUKOV *et al.*, 2011). Nosso estudo também identificou uma maior frequência de FR positivo em indivíduos carreadores do SE, concordante com o demonstrado por Gan *et al*, que observaram maior frequência de FR, anti-CCP e anticorpos anti-proteínas carbamiladas (ACarPs) na presença de SE (GAN *et al.*, 2015).

Apesar das consistentes evidências da participação do HLA-DR01/04 na etiopatogenia da AR, é crescente a descrição também de genes não-HLA nos processos de risco de suscetibilidade e de progressão da doença, a maioria dos quais implicados em produtos de genes reguladores e efetores imunes (OKADA *et al.*, 2014). Partindo dessa observação, um dos objetivos do estudo foi avaliar a associação entre seis variantes genéticas selecionadas da IDO1 e o risco de desenvolver AR. Para isso, foram comparadas as amostras dos indivíduos com AR às amostras de controles saudáveis. A partir disso, não foram observadas associações estatisticamente significantes entre os polimorfismos rs7820268, rs3739319, rs9298586, rs61753677 e rs35059413 e o maior risco de apresentar AR. A variante rs35099072, por sua vez, não foi avaliada quanto a esse desfecho, já que 100% da amostra de pacientes e controles apresentou genótipo selvagem (GG). Foram avaliadas também associações desses polimorfismos com fatores de risco para AR e de mau prognóstico, bem como, com a atividade da enzima IDO1, através da relação Kyn/Trp; porém, não houve associações estatisticamente significantes.

A ausência de associação dos polimorfismos avaliados no nosso estudo com o risco de desenvolver AR pode estar relacionada ao que também é visto em outros *loci* de vulnerabilidade para AR que possuem risco relativo modesto, sendo este um dos motivos que têm limitado a elaboração de um teste genético diagnóstico para a doença (GORONZY AND WEYAND, 2009). É provável que a origem étnica influencie nos achados do nosso estudo. Arefayene *et al* (AREFAYENE *et al.*, 2009) encontraram variantes genéticas da IDO1, entre elas rs61733677, rs9298586 e rs3739319, tanto em indivíduos caucasianos e afrodescendentes; já os rs35059413 e rs35099072 foram vistos apenas em afrodescendentes, mas a associação com redução da função enzimática da IDO1 só foi determinada para o rs35099072, e em afrodescendentes. No nosso estudo, a avaliação desse SNP com o risco de desenvolver AR não foi possível, por só ter sido identificado genótipo homozigoto selvagem. É possível que, aumentando o número da nossa amostra, os demais genótipos desse SNP possam aparecer, dadas as frequências reduzidas dos alelos mutados nos SNPs estudados (Tabela 3.4), o que explicaria também a maior frequência dos genótipos selvagens entre os demais SNPs, especialmente para rs61753677, rs35059413, rs35099072 e rs9298586 (prevalências > 85%).

A demonstração pelos estudos de coorte envolvendo gêmeos aponta que, apesar dos fatores genéticos, especialmente do SE, influenciem indivíduos anti-

CCP positivos a manifestarem artrite, o estilo de vida e os fatores ambientais e estocásticos são mais importantes na determinação de quais indivíduos desenvolverão anti-CCP (HENSOLD *et al.*, 2015), sendo este um dos fatores que estimulou a outra etapa do nosso estudo. Pensando em propor uma nova relação entre genética, ambiente e função enzimática na etiopatogenia da AR, além da análise do polimorfismo genético da IDO1, avaliamos os metabólitos do triptofano e a atividade da enzima IDO1.

Como já discutido anteriormente, nosso estudo avaliou a associação do fator ambiental tabagismo com risco de positividade para FR e anti-CCP. Em relação à AR com anti-CCP positivo, muitos são os atrativos para a possibilidade de a resposta imune mediada pela célula T a autoantígenos modificados pós-translacionalmente ser iniciada no pulmão (MALMSTRÖM *et al.*, 2017). Entre esses indícios, está a presença de anti-CCP no escarro de indivíduos que também apresentam anti-CCPs séricos, mesmo sem artrite definida (WILLIS *et al.*, 2013); o lavado broncoalveolar de indivíduos anti-CCPs positivos e AR inicial (REYNISDOTTIR *et al.*, 2014); e o conhecimento de que a exposição pulmonar a agentes como tabaco e sílica induzem o aumento da expressão de PADs (PADYUKOV *et al.*, 2004; STOLT *et al.*, 2010; TOO *et al.*, 2016) e que contribui para acúmulo e ativação de várias células apresentadoras de antígenos (MALMSTRÖM *et al.*, 2017).

No entanto, muitos pacientes com AR não têm histórico de exposição a agente nocivo ao pulmão que possam iniciar a citrulinização por PADs ou formar estruturas linfoides que possam estimular a apresentação de antígenos e a ativação de células T e B (RANGEL-MORENO *et al.*, 2006), e/ou não têm anti-CCPs positivos no sangue que justifiquem o desenvolvimento da doença. Na nossa coorte, por exemplo, 18% eram FR ou anti-CCP negativos, e 51.5% de indivíduos de AR eram não tabagistas. Então, como explicar que pacientes com FR e anti-CCP negativos ou não tabagistas possam desenvolver AR?

Uma possibilidade é a que já vem sendo demonstrada com a descoberta de outros mecanismos pós-translacionais, além da citrulinização, e que podem contribuir para a formação de autoanticorpos envolvidos na patogênese da doença. Os ACarPs são um exemplo, gerados a partir de um processo não-enzimático – a carbamilação –, em que neo-epítomos surgem a partir da conversão de lisina e cianato em homocitrulina. Vários substratos, como a fibronectina, podem ser

carbamilados e gerar ACarPs (SHI *et al.*, 2011). Estes não causam artrite, mas os peptídeos modificados podem ser artritogênicos, já que foi observado que a transferência de linfócitos de camundongos imunizados com os peptídeos carbamilados gerou doença a camundongos *naive* (MYDEL *et al.*, 2010). Anticorpos que identificam proteínas acetiladas também têm sido descritos (JUAREZ *et al.*, 2016).

Além de anticorpos que reconhecem proteínas modificadas pós-translacionalmente, há, na AR, sistemas de anticorpos que especificamente reconhecem antígenos não modificados (KONIG *et al.*, 2016); entre eles, estão Fc-*gamma* (alvo do FR), hnRNP A2/B1 (RA33), calpastatina e PADI-4 (EDELMAN *et al.*, 1958; STEINER *et al.*, 1992; Mimori *et al.*, 1995; HARRIS *et al.*, 2008). Esses anticorpos anti-proteínas nativas são frequentemente detectados em indivíduos anti-CCP positivo e negativo, podendo ser capaz de distinguir fenótipos (HARRIS *et al.*, 2008; NELL-DUXNEUNER *et al.*, 2010; DARRAH *et al.*, 2013; Giles *et al.*, 2014). Essas descobertas vão de acordo com a ideia de que a AR com anti-CCP negativo pode ser ainda mais heterogênea e complexa quanto a sua etiopatogênese que a doença ACPA positivo (CATRINA *et al.*, 2014).

Outra possibilidade é que a doença se apresente de diversas maneiras, de acordo com a positividade para anti-CCP. Até o momento, é capaz de se concluir que a doença com anti-CCP positivo é muito dependente da resposta imune adaptativa dirigida pelo MHC de classe II, enquanto que, com anti-CCP negativo, é mais provável ter outros tipos de resposta envolvidos, ainda que a resposta imune adaptativa seja menos importante (CATRINA *et al.*, 2016).

Assim, as associações encontradas nos indivíduos com AR e a presença de alterações em microambientes extrapulmonares têm estimulado a busca de outros fatores ambientais candidatos a gatilhos para início da resposta imune na AR, bem como, novos locais onde esse processo possa ocorrer. Evidências têm sugerido que reações imune específicas de AR devem iniciar em locais extra-articulares, particularmente em outras superfícies mucosas, como a intestinal (CATRINA *et al.*, 2016). Esta, como as demais mucosas, tem componentes humorais solúveis e celulares de defesa da resposta imune inata, além de tecido linfático associado a mucosas (MACPHERSON *et al.*, 2008; RUDDLE AND AKIRAV, 2009) atuando como tecido linfático secundário, em que alternância de classe IgA e

expansão clonal de célula B ocorrem em resposta à ativação de célula T antígeno-específica (CESTA, 2006).

Porém, pouco ainda é explorado da relação entre mucosa intestinal e suscetibilidade para AR; apesar disso, alguns estudos têm relacionado o desequilíbrio na microbiota intestinal (disbiose) com a doença (SCHER *et al.*, 2013) (ABDOLLAHI-ROODSAZ *et al.*, 2016), especialmente nas fases iniciais da AR (Scher *et al.*, 2016). Muito da especulação quanto ao envolvimento do intestino na AR vem das evidências que relacionam infecções bacterianas na mucosa oral e AR, causada especialmente pela *Porphyromonas gingivalis* (MALMSTRÖM *et al.*, 2017). O envolvimento dessa bactéria na AR pode ser explicado pela capacidade do agente de produzir PAD (MCGRAW *et al.*, 1999) e de converter arginina em citrulina, gerando uma variedade de neoantígenos citrulinados (WEGNER *et al.*, 2010) a partir de peptídeos do hospedeiro e da bactéria (ABDULLAH *et al.*, 2013). Os níveis de anticorpos contra a bactéria e os títulos de anti-CCP têm mostrado uma correlação positiva entre si e a recuperação de DNA da *Porphyromonas gingivalis* no líquido sinovial (REICHERT *et al.*, 2013), sendo estes aspectos que favorecem a associação (MIKULS *et al.*, 2014).

O microbioma intestinal na suscetibilidade para AR também foi associado com HLA-DRB1. Gomez *et al.*, ao analisarem camundongos transgênicos carreadores do alelo de suscetibilidade para AR HLA-DRB1*0401, observaram que estes mostraram alteração na composição da microbiota intestinal com aumento na sua permeabilidade e diferença no perfil de citocinas, quando comparados a camundongos transgênicos carreadores do alelo HLA-DRB1*0402 de resistência à artrite (GOMEZ *et al.*, 2012).

É de se imaginar que, além de agentes infecciosos, outros agentes externos possam atuar alterando a integridade da mucosa intestinal, e consequentemente contribuindo para modificar o desempenho de suas atividades de barreira imune, absorção e síntese de substâncias (KAMADA *et al.*, 2012), podendo, assim, favorecer o desenvolvimento de AR ou perpetuar mecanismos inflamatórios já começados por outras vias. Entre um possível fator externo que poderia atuar na disbiose como coadjuvante nos mecanismos etiopatogênicos da AR está a dieta. Assim, ao avaliarmos o perfil de metabólitos do Trp, com o estudo Kyn e 5-HT, na etiopatogenia da AR, indiretamente investigamos a participação da dieta e da disbiose, já que uma parcela da 5-HT está localizada na circulação periférica,

produzida principalmente pelas células enterocromafins do intestino (GERSHON AND TACK, 2007), desempenhando, desse modo, uma ação nas células do sistema imune (BAGANZ AND BLAKELY, 2013).

A nossa população de AR e de controles saudáveis para estudo dos metabólitos do Trp, tanto para via das Kyns como para 5-HT, foi de 18 indivíduos em ambos os grupos. Comparando-se à população de AR do estudo genético (n=328), poucos pacientes de AR (5.48%) participaram dessa etapa. Apesar de uma pequena amostra ser capaz de impossibilitar análises de associação quanto às concentrações plasmáticas do Trp e Kyn, bem como, na relação Kyn/Trp, quando comparados os grupos de AR e os de indivíduos saudáveis ($p > 0.05$), e quando avaliados subgrupos de AR quanto à atividade da doença, à resposta ao MTX e à presença de SE, FR e anti-CCP, para as concentrações plasmáticas de 5-HT o tamanho da amostra não inviabilizou a análise.

Quanto à concentração plasmática de 5-HT, níveis menores foram observados nos pacientes de AR com quando comparados aos indivíduos controles. Esses achados divergem dos encontrados na literatura (VOOG *et al.*, 2004; KOPP AND ALSTERGREN, 2002) quando analisam concentração de 5HT em AR. Kopp *et al* compararam indivíduos portadores de AR com FR positivo e maior atividade inflamatória e indivíduos com AR com teste negativo para FR e, a partir disso, identificaram níveis plasmáticos mais elevados de 5-HT no primeiro grupo. Concentrações plasmáticas mais elevadas de 5-HT também foram observadas quando comparados os pacientes com AR e os indivíduos controles (KOPP AND ALSTERGREN, 2002). Apesar de não haver determinação das PAIs no grupo controle – um parâmetro indireto para avaliar perfil de inflamação –, nesse estudo níveis plasmáticos elevados de 5-HT estavam associados à inflamação na AR.

Essa associação de inflamação com níveis plasmáticos mais elevados da 5-HT na AR pode ser explicado pela forma de liberação da molécula no sangue a partir da ativação das plaquetas. A biodisponibilidade da molécula nos tecidos é dependente da taxa de síntese e metabolismo (TYCE, 1990), sendo a 5-HT proveniente do metabolismo do Trp que ocorre nas duas etapas enzimáticas anteriormente descritas. Embora ambas as enzimas, TPH e AADC, sejam necessárias para a produção de 5-HT a partir do Trp, a TPH é a enzima limitante, já que ela tem muito pouca afinidade por qualquer outro aminoácido e é encontrada apenas em tecidos que contenham 5-HT (NOGUCHI *et al.*, 1973). Como tentativa de

proteger a 5-HT da rápida metabolização, a molécula é armazenada por transportadores de recaptação de serotonina (SERT) (BERTRAND AND BERTRAND, 2010), que são expressos transmembrana no SNC, no TGI, nas plaquetas e nos vasos pulmonares e periféricos (RUDNICK, 2006). Quase toda 5-HT circula no interior das plaquetas, armazenada através de SERTs (BERTRAND AND BERTRAND, 2010) em vesículas intracitoplasmáticas, e é liberada por exocitose, em um processo dependente de cálcio (RACKÉ *et al.*, 1996), em resposta à ativação plaquetária por isquemia, dano endotelial (MAURER-SPUREJ *et al.*, 2004; JONNAKUTY AND GRAGNOLI, 2008) ou imunocomplexos, como FR (CUNNINGHAM *et al.*, 1986).

Em plaquetas de pacientes com doenças reumáticas, têm sido encontrado um menor número de organelas intracelulares armazenando 5-HT, quando comparadas às de indivíduos saudáveis, indicando que as plaquetas foram ativadas para liberação de 5-HT. Consequentemente, a quantidade de 5-HT nas plaquetas está diminuída em um episódio agudo de AR (ZELLER *et al.*, 1983). A redução de 5-HT na nossa população de AR não pode ser explicada pela menor média no número de plaquetas, já que, quando comparada aos indivíduos controles, não houve diferença estatisticamente significativa nessa variável. Quanto ao grau de atividade inflamatória, nossa amostra foi caracterizada por baixa atividade inflamatória (DAS-28 PCR = 3.2 ± 1.3), sem outras evidências de inflamação, apresentando valores normais de PAIs e poucas articulações acometidas. Assim, uma possibilidade de termos menores níveis plasmáticos de 5-HT na nossa população é que, pela ausência de um processo inflamatório ativo, não houve liberação do estoque intracitoplasmático de plaquetas na corrente sanguínea. A existência ou não de um processo inflamatório nos nossos indivíduos de AR, por sua vez, poderia ter sido melhor avaliado se tivéssemos determinado o perfil de citocinas e células predominantes.

A disponibilidade de 5-HT no plasma pode também ser influenciada pela atividade dos 5-HTRs. Existem sete famílias de 5-HTRs distribuídas de forma heterogênea pelo corpo (tabela 1.2), estando, a maioria delas, presentes em células do sistema imune (SHAJIB AND KHAN, 2015). A expressão desses receptores nessas células e a capacidade de absorver 5-HT reforçam a participação da 5-HT na resposta imune inata. A ação da 5-HT através de seus receptores não é desviada exclusivamente a favor da inflamação: Las Casas-Engel *et al* observaram que

ativação de 5-HTR2B e de 5-HTR7 direcionou macrófagos para uma ação anti-inflamatória (DE LAS CASAS-ENGEL *et al.*, 2013).

Além de não termos conhecimento de qual(is) célula(s) do sistema imune predominava(m), bem como do(s) tipo de 5-HTR(s), e se este(s) estava(m) sendo estimulado(s) ou não para uma ação inflamatória, é possível que a menor concentração plasmática de 5-HT vista em nossos pacientes esteja relacionada à densidade e à afinidade desses receptores, influenciados por fatores presentes na AR. Foi demonstrado que pacientes de AR apresentaram menor densidade de receptor de 5-HT₂ em plaquetas quando comparado a indivíduos controles (KLING *et al.*, 2006). Assim, se na nossa amostra alguma família de 5-HTR estava superexpressa em um determinado tipo celular, contribuindo de alguma forma para redução dos níveis plasmáticos de 5-HT encontrados, será um questionamento.

Outro aspecto que poderia influenciar a concentração plasmática de 5-HT seria o uso de medicações. Quando usado paraclorofenilalanina, um inibidor irreversível do TPH, houve a depleção de 5-HT, ocasionando supressão da capacidade dos macrófagos ativarem células T (BAGANZ AND BLAKELY, 2013). Além da possibilidade de medicamentos inibirem alguma etapa na produção da 5-HT, eles podem afetar sua disponibilidade na corrente sanguínea. Os ISRS, por exemplo, estavam presentes em cinco (27.8%) dos 18 pacientes de AR avaliados na nossa amostra e, apesar de haver uma tendência do uso de ISRS estar associado a menores níveis plasmáticos de 5-HT ($p = 0.0593$), não se pode afirmar, com os dados disponíveis, que houve interferência dessa medicação nos níveis plasmáticos de 5-HT.

Ainda como fator que pudesse influenciar nos níveis plasmáticos de 5-HT de portadores de AR, estaria a terapia com MMCD em uso no momento da avaliação. Genefke *et al* observaram que pacientes com AR, após serem expostos a doses elevadas de corticoide (50 mg EV), apresentaram taxas menores de 5-HT livre no plasma, com valor médio de 6.0 ng/ml (± 2.0), quando comparados àqueles sem essa exposição ($p < 0.001$) (GENEFKE *et al.*, 1968). Apesar da concentração média de 5-HT encontrada nos indivíduos de AR pelos autores citados ser bem próxima da que encontramos, nosso grupo de AR não estava sob a influência de doses imunossupressoras de corticoide – 61.1% dos indivíduos usavam prednisona na dose de 5mg/dia, dose máxima observada nos pacientes deste estudo.

A imunossupressão mediada pelo tratamento poderia ser explicada, se não pelo uso de corticoide na nossa população, pelo uso de MMCDs. Klavdianou *et al* avaliaram a espondilite anquilosante (EA) – outra doença reumática com intensa participação de citocinas inflamatórias, elevação de PCR e sacroileíte com edema ósseo – e observaram concentrações menores de 5-HT nos pacientes de EA em uso de bloqueadores do TNF α (KLAVDIANOU *et al.*, 2016). Nossa amostra apresentava 61.2% dos indivíduos de AR em uso de agentes biológicos e 88.9% em uso de alguma MMCD; além disso, apesar da presença de tratamento não ter mostrado associação estatisticamente significativa com os níveis plasmáticos de 5-HT ($p = 0.6405$), essa associação foi observada com os níveis de Trp ($p = 0.0017$).

Ainda para justificar os menores níveis de 5-HT observados, sendo a 5-HT produzida a partir do Trp, imaginou-se que, além de possíveis fatores que alterariam a ação das enzimas envolvidas nesse processo, como já mencionado, pudesse estar ocorrendo um desvio do metabolismo do Trp para a via das Kyns, caracterizado por menor concentração plasmática de Trp e/ou maior de Kyn, com maior atividade da IDO1, explicando os valores reduzidos de 5-HT no plasma da nossa população, já que a disponibilidade do Trp para gerar 5-HT estaria reduzida. Porém, não foi vista diferença estatisticamente significativa nas concentrações plasmáticas de Trp e Kyn e na relação KTR, quando comparados os grupos de portadores de AR e de indivíduos saudáveis.

Quando comparamos as concentrações plasmáticas dos metabólitos do Trp entre portadores de AR sem tratamento e os que estavam em uso de MMCDs, vimos que os primeiros (11.1%) apresentavam menores valores de Trp ($p = 0.0016$). Os pacientes sem tratamento estavam em alta atividade inflamatória, enquanto pacientes com tratamento estavam com baixo grau de atividade inflamatória. Apesar de essa associação ter sido identificada ao se comparar uma amostra muito pequena de AR sem tratamento ($n=2$) com o grupo em tratamento ($n=16$), outros estudos já demonstraram concentração plasmática de Trp reduzida em pacientes com AR, mas isso quando comparados a indivíduos saudáveis (FILIPPINI *et al.*, 2012; (SCHROECKSNADEL *et al.*, 2003; SCHROECKSNADEL *et al.*, 2006; LABADARIOS *et al.*, 1978). Os níveis reduzidos de Trp no plasma nesses pacientes se relacionaram com a pior classe funcional da AR, sem dados sobre DAS28 (SCHROECKSNADEL *et al.*, 2006).

Muito do perfil dos metabólitos da via das Kyns vem de estudos *in vitro*. Enquanto IDO1 pode causar reduções significativas na disponibilidade do Trp *in vitro*, ainda necessita ser demonstrado se um efeito semelhante ocorre *in vivo*, onde diminuições locais na disponibilidade são esperadas para serem rapidamente compensadas através de difusão no entorno dos tecidos (LÖB *et al.*, 2009). *In vivo*, um aumento da degradação mediada por citocinas é observado sempre que a resposta celular (tipo Th1) está induzida; contudo, neste caso, um aumento concomitante de Kyns ou de outros produtos do Trp podem ser detectados (BYRNE *et al.*, 1986; WERNER *et al.*, 1988; WIRLEITNER *et al.*, 2003).

Assim, considerando que os indivíduos com menores níveis de Trp da nossa amostra têm indícios de doença em maior grau de atividade inflamatória, poderíamos supor que um perfil de citocinas estivesse atuando para uma maior atividade da IDO1 com consequente depleção de Trp, já que o balanço entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias pode determinar o status de atividade da IDO1 (BADAWY, 2017a). Porém, como não observamos aumento dos níveis plasmáticos de Kyns ou alteração na taxa de Kyn/Trp, e como não dispomos do perfil de citocinas e/ou de outros subprodutos do Trp, não podemos inferir, a partir dos dados disponíveis, que a inflamação esteja favorecendo a indução da IDO1 e, consequentemente, sendo responsável por um menor valor de Trp nos indivíduos de AR sem tratamento.

Outra hipótese que poderia ser aventada para explicar menores níveis plasmáticos de Trp nesse subgrupo de AR seria a de que estivesse ocorrendo uma depleção do Trp devido à utilização desse aminoácido por outras vias de resposta do paciente contra as células efetoras e/ou como uma tentativa das células autorreativas da resposta imune desse grupo se protegerem, internalizando o Trp do meio extracelular. A redução da disponibilidade do Trp promove o acúmulo de espécies de t-RNA não carregadas, resultando em controle da síntese proteica, que, por sua vez, geralmente é acompanhada de bloqueio do ciclo celular nas células imunes, gerando irresponsividade a desafios imunológicos (MUNN *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2009). Zhu *et al* observaram também que uma hiperexpressão da triptofanil-tRNA-sintetase (TTS) – enzima citoplasmática relacionada ao armazenamento de Trp – ocorria nas células T de líquido sinovial de pacientes com AR, e que esse aprisionamento de Trp para síntese proteica, atuando como reserva, se configurava

como mecanismo de resistência das células T autorreativas, em pacientes de AR, à depleção do TRP mediada pela IDO (Zhu *et al.*, 2006).

Nossa observação de níveis reduzidos de Trp em indivíduos de AR sem tratamento ainda poderia ser explicada por fatores do próprio indivíduo, que não foram controlados no nosso estudo. Fatores endógenos, como insulina, cortisol e glucagon, e individuais, como idade, sono e atividade física, podem interferir na regulação da renovação proteica e, por fim, nas concentrações do Trp no plasma (SIMMONS *et al.*, 1984; CYNBER, 2002). Além disso, o Trp é proveniente da dieta, e uma ingesta deficiente poderia explicar níveis endógenos menores. Em condições normais, é descrita que a redução de Trp em consequência da menor ingesta ocasionaria menores níveis de Kyns, também pelo fato destes se relacionarem aos de Trp (SCHRÖCKSNADEL *et al.*, 2006). Considerando que os níveis de Trp foram menores em indivíduos de AR e sem tratamento, uma dieta inadequada de Trp poderia contribuir também para os menores níveis deste aminoácido, uma vez que, ao analisamos indivíduos de AR, os níveis de Kyns poderiam não acompanhar necessariamente os de Trp, caso fatores presentes na AR interferissem nessa relação direta.

Quanto à atividade da IDO1 (Kyn/Trp), apenas a presença do tabagismo apresentou associação estatisticamente significativa, sendo a atividade da IDO1 menor em indivíduos de AR tabagistas quando comparada com a de não tabagistas ($p = 0.0322$). Os menores valores da relação Kyn/Trp foram acompanhados de menores níveis plasmáticos de Kyn ($p = 0.0393$), sem alteração com os níveis de Trp ($p = 0.73$). Tem-se que a participação da IDO1 na resposta imune através da via das Kyns ocorre pelos mecanismos, que podem ocorrer mutuamente, de privação de Trp e de aumento de Kyns (MUNN *et al.*, 1999). Então, considerando que poderia ocorrer alteração nos níveis de Kyns e KTR sem concomitante alteração nos de Trp – dada ausência de diferença estatisticamente significativa para essa variável –, poderíamos procurar relações entre tabagismo e níveis reduzidos da IDO1, partindo de considerações sobre o AhR.

Entre os diversos componentes do cigarro, os hidrocarbonos aromáticos policíclicos – tais como o 3-metilcolantreno e o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) – configuram entre os principais agentes tóxicos, e a maioria dos seus efeitos são resultado da ligação com AhR, um fator de transcrição ativado por ligante (OKEY *et al.*, 1994), expresso em altos níveis nas células imunes (ESSER AND

RANNUG, 2015) e no tecido sinovial de pacientes de AR (KOBAYASHI *et al.*, 2008). Além dos ligantes exógenos, o AhR também tem ligantes naturais provenientes da dieta, do microbioma, da ação enzimática do hospedeiro e da flora comensal, elementos que podem atuar no receptor como agonistas, a exemplo dos metabólitos do Trp, como Kyn e 6-formilindole [3,2-b] carbazole (FICZ) (QUINTANA AND SHERR, 2013).

Além de agonistas do AhR, têm sido descritos inúmeros antagonistas. Na linhagem MH7A de fibroblastos sinoviais de pacientes de AR, a α -naftoflavona inibiu a indução de IL-1 β pelo cigarro, que contém, entre outros compostos, o TCDD (ADACHI *et al.*, 2013). Já o resveratrol, uma molécula encontrada no vinho tinto, inibe a sinalização via AhR, diminuindo a indução mediada por TCDD de IL-17 em condições de polarização para Th17 *in vitro*, podendo, assim, diminuir a geração de Th17 (XUZHU *et al.*, 2012). Outro composto antagonista do AhR mais potente é o GNF351, que reduz a produção induzida por IL-1 β de fatores de crescimento, como o fator A de crescimento de endotélios vasculares (VEGF-A) em pacientes com FLS de AR por meio de um mecanismo dependente de AhR (LAHOTI *et al.*, 2014).

Como as DCs são as principais células a expressarem IDO1, o comportamento do AhR nessas células pode ajudar no entendimento de uma possível participação deste na indução da IDO1. Estudos anteriores determinaram que DCs ativadas pelo TCDD *in vitro* apresentaram aumento na expressão de IDO1, (VOGEL *et al.*, 2008; MEZRICH *et al.*, 2010); contudo, essa ativação não ocorreu quando exposto ao ligante FICZ, bem como, com o uso concomitante de 3'-metoxi-4'-nitroflavona (MNF) - um antagonista do AhR - e de TCDD, em que ficou claro o bloqueio na indução da IDO1 pelo MNF (VOGEL *et al.*, 2008). Assim, embora haja evidências de que a ativação de AhR em DCs ocasione principalmente ação anti-inflamatória, ainda não existem dados disponíveis sobre a expressão de AhR em diferentes subpopulações de DCs (GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ AND QUINTANA, 2018). Nesse sentido, a não avaliação de DCs em nosso estudo pode contribuir para a dificuldade na interpretação dos nossos achados.

A partir dessas evidências, percebemos que vários fatores podem interferir na relação entre AhR e IDO1, tais como, tipo e presença de agonista e/ou antagonista e afinidade pelo receptor, influências do microambiente – como perfil de citocinas –, e expressão do AhR variável, a depender dos tipos celulares, tornando-se impossível concluir quais tipo(s) de desequilíbrio(s) possa(m) ter ocorrido(s) na

nossa amostra que resultaram em menores níveis plasmáticos de Kyns e de KTR (Kyn/Trp). Caso acreditemos que o papel de antagonistas e/ou do perfil de citocinas presentes no meio sejam preponderantes, podemos pensar que o AhR inativado por eles, independente da exposição aos possíveis agonistas do AhR presentes no cigarro, não estimularia a enzima IDO1, resultando em valores plasmáticos reduzidos de Kyn e de atividade enzimática (Kyn/Trp), por provável desvio de metabolização ou de não metabolização do Trp pela via das Kyns. Caso, porém, os componentes do cigarro, entre eles o TCDD, atuem preponderantemente como agonistas do AhR na nossa amostra, favorecidos por um meio propício, podemos elaborar duas hipóteses, a seguir detalhadas.

A primeira está de acordo com o papel imunossupressor do AhR nas DCs. Foi demonstrado que, em DCs tolerogênicas presentes em tumor, a expressão de IDO1 é sustentada por uma alça autócrina que envolve AhR e Kyn (LI *et al.*, 2016). Assim, na nossa amostra, o AhR estaria ocupado pelos ligantes contidos no cigarro, o que prejudicaria a ligação com as Kyns inicialmente produzidas, interrompendo a alça de indução Kyn-AhR-IDO1, além de reduzir a atividade da IDO1 e ainda mais a produção de Kyn e de outros possíveis metabólitos do Trp.

A segunda hipótese é a de que, com a ativação do AhR por componentes do cigarro, um ambiente imunossupressor seria favorecido e estabelecido e, como uma forma de preservação de Trp para outras questões celulares de síntese proteica, uma menor ação da IDO1 ocorreria, já que o papel imunossupressor das Kyns seria, nessa situação, secundário ou menos relevante.

Pelo desenho do nosso estudo, os resultados de associação obtidos, especialmente quanto à participação da 5-HT e da via das Kyns na AR, não podem, nesse momento, ser explicados. Grande parte da dificuldade na comparação entre nossos achados e os de outros estudos, e consequentemente da sua interpretação, vem da variabilidade das amostras, algumas vezes sem dados sobre tempo de evolução da doença, positividade de autoanticorpos, terapia em uso e atividade inflamatória, especialmente com determinação de citocinas e células da resposta imune preponderantes.

Um melhor entendimento do microambiente em que a AR se inicia e evolui também é fortalecido pelos dados de epigenética. Foi demonstrado que a metilação única no CpG da região promotora do gene da CTLA-4 nas células Tregs de pacientes com AR resultou na ligação prejudicada do fator nuclear de células T

ativadas. Em decorrência dessa desregulação da CTLA-4, as Tregs foram incapazes de ativar a enzima indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO1) que degrada o triptófano e, conseqüentemente, a via imunomoduladora das quinureninas foi prejudicada (CRIBBS *et al.*, 2014).

Além de não termos disponíveis o tipo de células específicas e as citocinas presentes no meio inflamatório, a ausência de divisão da nossa amostra em grupos, por exemplo, sem e com uso de MMCDs, ou com presença e ausência de atividade inflamatória, e aliada ao controle de fatores individuais que poderiam influenciar nos resultados dos metabólitos – tais como sono, dieta e atividade física –, todos acabam por dificultar as conclusões sobre a participação desses metabólitos do Trp na etiopatogenia da AR. O controle de tais fatores, mesmo em modelos animais de AR, é um desafio, especialmente com o crescente número de evidências da disbiose na mucosa intestinal e de alterações na resposta imune. Caso seja proposto um estudo com modelo experimental de AR para avaliação dos metabólitos do Trp da dieta, a flora comensal deverá ser considerada na interpretação de resultados, pois, como já destacado por Dant *et al* em estudos experimentais, efeitos no AhR de Tregs podem ser influenciados pelo modelo utilizado, provavelmente refletindo efeitos tecidos-específicos e/ou a contribuição heterogênea de agonistas provenientes da flora comensal (DANT *et al.*, 2017). Além disso, como a metabolização do Trp é predominantemente realizada pela via das Kyns, sendo a principal enzima da via a IDO1, o modelo experimental poderá afetar também os resultados. As observações em diferentes modelos animais de artrite têm revelado que, dependendo da situação *in vivo*, a ação da IDO1 pode ser de estímulo à resposta imune, como no modelo (K/BxN) de células B autorreativas, ou de imunossupressão, como no modelo de CIA, demonstrando ações complexas da enzima IDO1 na AR e necessidade de identificar as variantes da ação imunomodulatória da enzima (YEUNG *et al.*, 2015).

Assim, achados *in vivo* ainda se tornam mais desafiadores quanto às interpretações de resultados, especialmente em estudos de associação como o que foi realizado. A heterogeneidade de aspectos individuais e a ausência de fatores que possam caracterizar um processo de causa e efeito tornam as análises muitas vezes mais questionadoras do que esclarecedoras, e o que surge com os resultados desse estudo são novas hipóteses a serem testadas. Denota-se, dessa forma, a

necessidade de melhor entendimento da participação dos metabólitos do Trp e da atividade da IDO1, bem como de suas interações epigenéticas e genéticas na AR.

A busca por elementos novos que possam estar associados à etiopatogênese da doença, que favoreçam um diagnóstico precoce e, ao mesmo tempo, que seja de fácil acesso e de custo aceitável para indivíduos e Estado, foi o principal impulsionador desse estudo. Tais elementos, se encontrados, poderiam auxiliar no desenvolvimento e implantação de terapias preventivas, em que a denominada "janela de oportunidade" (termo utilizado atualmente para o período de intervenções terapêuticas na fase inicial da AR) poderia ser transportada para uma fase pré-clínica, com o emprego de terapias antes de qualquer sintoma da doença (SMOLEN *et al.*, 2016). Entendendo o microambiente em que o processo inflamatório da AR ocorre e o quanto as vias secundárias, como possivelmente a das Kyns e a da 5-HT, interferem na resposta imune inata e adaptativa, intervenções na dieta e prevenção à exposição a fatores ambientais poderiam ser adequadamente traçadas. Ademais, identificada e compreendida as participações da 5-HT ou das Kyns na AR, potenciais pesquisas relacionadas aos receptores 5-HTR e AhR em células imunes de pacientes de AR poderiam ser propostas, na busca de agonistas ou antagonistas desses receptores que poderiam atuar como adjuvantes dos MMCDs, tanto sintéticas quanto biológicas, no tratamento da doença.

O reduzido número de indivíduos com AR avaliado na nossa coorte pode explicar a ausência de associação entre as variantes genéticas da IDO1 e o risco de desenvolver a doença, bem como com os fatores de risco e de mau prognóstico. Apesar disso, a heterogeneidade da AR e dos indivíduos em geral, combinada a mecanismos imunes cada vez mais diversos, têm tornado distante a possibilidade de identificar um fator etiológico único para a doença. A elaboração de escores de risco e de prognóstico, baseados em aspectos genéticos, epigenéticos e ambientais, aparece cada vez mais como um desafio a ser implantado à prática clínica.

6 CONCLUSÕES

A concentração plasmática de serotonina está reduzida na artrite reumatoide.

A concentração plasmática de triptófano está reduzida em pacientes com AR sem tratamento com drogas modificadoras do curso da doença.

A concentração plasmática de quinureninas e a atividade da indoleamine 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) estão reduzidas em portadores de artrite reumatoide tabagistas.

As variantes genéticas da indoleamine 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) analisadas não estão associadas à suscetibilidade para artrite reumatoide e nem a fatores de risco e de mau prognóstico da doença.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI-ROODSAZ, S.; ABRAMSON, S. B.; SCHER, J. U. The metabolic role of the gut microbiota in health and rheumatic disease: mechanisms and interventions. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 8, p. 446-55, 08 2016. ISSN 1759-4804. Available at: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27256713> >. Acesso em: 01 mai 2018.

ABDULLAH, S. N. *et al.* Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase substrate specificity. **Anaerobe**, v. 23, p. 102-8, Oct 2013. ISSN 1095-8274. Available at: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856045> >. Acesso em: 01 mai 2018.

ADACHI, M. *et al.* Cigarette smoke condensate extracts induce IL-1-beta production from rheumatoid arthritis patient-derived synoviocytes, but not osteoarthritis patient-derived synoviocytes, through aryl hydrocarbon receptor-dependent NF-kappa-B activation and novel NF-kappa-B sites. **J Interferon Cytokine Res**, v. 33, n. 6, p. 297-307, Jun 2013. ISSN 1557-7465. Available at: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452206> >. Acesso em: 01 mai 2018.

AHERN, G. P. 5-HT and the immune system. **Curr Opin Pharmacol**, v. 11, n. 1, p. 29-33, Feb 2011. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21393060> >. Acesso em: 01 mai 2018.

AHMADI, M. *et al.* Epigenetic modifications and epigenetic based medication implementations of autoimmune diseases. **Biomed Pharmacother**, v. 87, p. 596-608, Mar 2017. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28086135> >. Acesso em: 01 mai 2018.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 3, p. 130-6, Mar 2005. ISSN 1568-9972. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823498> >. Acesso em: 01 mai 2018.

ALBRECHT, K.; ZINK, A. Poor prognostic factors guiding treatment decisions in rheumatoid arthritis patients: a review of data from randomized clinical trials and cohort studies. **Arthritis Res Ther**, v. 19, n. 1, p. 68, Mar 2017. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28335797> >. Acesso em: 01 mai 2018.

ALETAHA, D.; ALASTI, F.; SMOLEN, J. S. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. **Arthritis Res Ther**, v. 17, p. 229, Aug 2015. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26307354> >. Acesso em: 01 mai 2018.

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> >. Acesso em: 01 mai 2018.

ALETAHA, D.; SMOLEN, J. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 23, n. 5 Suppl 39, p. S100-8, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0392-856X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16273793> >. Acesso em: 01 mai 2018.

ANAYA, J. M. Common mechanisms of autoimmune diseases (the autoimmune tautology). **Autoimmun Rev**, v. 11, n. 11, p. 781-4, Sep 2012. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353402> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ANQUETIL, F. *et al.* IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. **J Immunol**, v. 194, n. 8, p. 3664-74, Apr 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25769920> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ANZILOTTI, C. *et al.* Antibodies to viral citrullinated peptide in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 33, n. 4, p. 647-51, Apr 2006. ISSN 0315-162X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511941> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

AREFAYENE, M. *et al.* Identification of genetic variants in the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) gene, which have altered enzyme activity. **Pharmacogenet Genomics**, v. 19, n. 6, p. 464-76, Jun 2009. ISSN 1744-6872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514129> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

AREND, W. P.; FIRESTEIN, G. S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, n. 10, p. 573-86, Oct 2012. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22907289> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ASTORGA, G. P.; WILLIAMS, R. C. Altered reactivity in mixed lymphocyte culture of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 12, n. 6, p. 547-54, Dec 1969. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5363253> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

AUNE, T. M.; POGUE, S. L. Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. **J Clin Invest**, v. 84, n. 3, p. 863-75, Sep 1989. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2503544> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BADAWY, A. A. Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 10, p. 878-93, Oct 2013. ISSN

1461-7285. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23904410>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. **Biosci Rep**, v. 35, n. 5, Sep 2015. ISSN 1573-4935. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26381576>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. **Int J Tryptophan Res**, v. 10, p. 1178646917691938, 2017a. ISSN 1178-6469. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469468>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements. **Neuropharmacology**, v. 112, n. Pt B, p. 248-263, Jan 2017b. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617070>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1245-53, Aug 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466340>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BAGANZ, N. L.; BLAKELY, R. D. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. **ACS Chem Neurosci**, v. 4, n. 1, p. 48-63, Jan 2013. ISSN 1948-7193. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336044>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BALLESTAR, E. Epigenetics lessons from twins: prospects for autoimmune disease. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 39, n. 1, p. 30-41, Aug 2010. ISSN 1559-0267. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19653134>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BARTON, A.; WORTHINGTON, J. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture. **Arthritis Rheum**, v. 61, n. 10, p. 1441-6, Oct 2009. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19790122>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BEGOVICH, A. B. et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet**, v. 75, n. 2, p. 330-7, Aug 2004. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208781>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BELLUCCI, E. et al. One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 34, n. 5, p. 793-801, 2016 Sep-Oct 2016. ISSN 0392-856X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27716458>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BENDER, D. A. Biochemistry of tryptophan in health and disease. **Mol Aspects Med**, v. 6, n. 2, p. 101-97, 1983. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6371429> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annu Rev Med**, v. 60, p. 355-66, 2009. ISSN 1545-326X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630576> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BERGER, S. L. et al. An operational definition of epigenetics. **Genes Dev**, v. 23, n. 7, p. 781-3, Apr 2009. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339683> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BERTOLINI, D. R. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature**, v. 319, n. 6053, p. 516-8, 1986 Feb 6-12 1986. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3511389> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BERTRAND, P. P.; BERTRAND, R. L. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. **Auton Neurosci**, v. 153, n. 1-2, p. 47-57, Feb 2010. ISSN 1872-7484. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729349> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BLIZIOTES, M. Update in serotonin and bone. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 9, p. 4124-32, Sep 2010. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823465> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BOEHME, S. A. et al. Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin. **J Immunol**, v. 173, n. 6, p. 3599-603, Sep 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356103> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BOISSIER, M. C. et al. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. **J Autoimmun**, v. 39, n. 3, p. 222-8, Sep 2012. ISSN 1095-9157. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704962> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BOMBARDIERI, M. et al. A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 10, p. 1857-65, Oct 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798884> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BOSSINI-CASTILLO, L. et al. A genome-wide association study of rheumatoid arthritis without antibodies against citrullinated peptides. **Ann Rheum Dis**, v. 74, n. 3, p. e15, Mar 2015. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532677> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

BRAUN, D.; LONGMAN, R. S.; ALBERT, M. L. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. **Blood**, v. 106, n. 7, p.

2375-81, Oct 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947091>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BRAUN, T.; ZWERINA, J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 4, p. 235, Jul 2011. ISSN 1478-6362. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21861862>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BRUCE, B.; FRIES, J. F. The Health Assessment Questionnaire (HAQ). **Clin Exp Rheumatol**, v. 23, n. 5 Suppl 39, p. S14-8, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0392-856X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16273780>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BURKIN, D. J. *et al.* Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. **Genomics**, v. 17, n. 1, p. 262-3, Jul 1993. ISSN 0888-7543. Disponível em:
<<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8406467>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BYRNE, G. I. *et al.* Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. **J Interferon Res**, v. 6, n. 4, p. 389-96, Aug 1986. ISSN 0197-8357. Disponível em:
<<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3095441>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

CANTLEY, M. D. *et al.* Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 6, p. 532-41, Jun 2011. ISSN 1600-051X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21434962>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

CARLIN, J. M. *et al.* Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. **J Immunol**, v. 139, n. 7, p. 2414-8, Oct 1987. ISSN 0022-1767. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2443564>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

CATRINA, A. I. *et al.* Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis. **Immunol Rev**, v. 269, n. 1, p. 162-74, Jan 2016. ISSN 1600-065X. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26683152>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 11, p. 645-53, Nov 2014. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25072264>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

CESTA, M. F. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. **Toxicol Pathol**, v. 34, n. 5, p. 599-608, 2006. ISSN 0192-6233. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067945>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

CHABAUD, M. *et al.* Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. **Cytokine**, v. 12, n. 7, p. 1092-9, Jul 2000. ISSN 1043-4666. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880256> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CHAUVEAU, J. *et al.* Rapid and specific enzyme immunoassay of serotonin. **Clin Chem**, v. 37, n. 7, p. 1178-84, Jul 1991. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1855288> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CHEN, W. *et al.* The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. **J Immunol**, v. 181, n. 8, p. 5396-404, Oct 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832696> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CHEN, X. *et al.* Inactivation of DAP12 in PMN inhibits TREM1-mediated activation in rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0115116, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642940> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CHENG, P. *et al.* Association between CCR6 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 4, p. 5388-96, 2015. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131115> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CHUNG, I. M. *et al.* Rheumatoid Arthritis: The Stride from Research to Clinical Practice. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 6, Jun 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27338350> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CICCIA, F. *et al.* Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 54, n. 12, p. 2264-72, Dec 2015. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26178600> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CIECHOMSKA, M.; O'REILLY, S. Epigenetic Modulation as a Therapeutic Prospect for Treatment of Autoimmune Rheumatic Diseases. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 9607946, 2016. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27594771> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

COBBOLD, S. P. *et al.* Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 29, p. 12055-60, Jul 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567830> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CONSULTATION, J. W. F. U. E. Protein and amino acid requirements in human nutrition. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 935, p. 1-265, back cover, 2007. ISSN 0512-3054. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18330140> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

COOPER, G. S.; MILLER, F. W.; PANDEY, J. P. The role of genetic factors in autoimmune disease: implications for environmental research. **Environ Health**

Perspect, v. 107 Suppl 5, p. 693-700, Oct 1999. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502533> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CORSIERO, E. et al. NETosis as Source of Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. **Front Immunol**, v. 7, p. 485, 2016. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27895639> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

COSTENBADER, K. H. et al. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. **Am J Med**, v. 119, n. 6, p. 503.e1-9, Jun 2006. ISSN 1555-7162. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16750964> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CRIBBS, A. P. et al. Treg cell function in rheumatoid arthritis is compromised by ctla-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 9, p. 2344-54, Sep 2014. ISSN 2326-5205. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24891289> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CROSS, M. et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. **Ann Rheum Dis**, v. 73, n. 7, p. 1316-22, Jul 2014. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550173> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CRUZ-TAPIAS, P. et al. Shared HLA Class II in Six Autoimmune Diseases in Latin America: A Meta-Analysis. **Autoimmune Dis**, v. 2012, p. 569728, 2012. ISSN 2090-0430. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577522> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CUNNINGHAM, T. J. et al. Platelet releasing activity in sera of patients with rheumatoid vasculitis. **Ann Rheum Dis**, v. 45, n. 1, p. 15-20, Jan 1986. ISSN 0003-4967. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3485407> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CYNOBER, L. A. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. **Nutrition**, v. 18, n. 9, p. 761-6, Sep 2002. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297216> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

CÔTÉ, F. et al. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 5, p. 232-8, May 2004. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121050> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

D'AGOSTINO, M. A.; BREBAN, M. Ultrasonography in inflammatory joint disease: why should rheumatologists pay attention? **Joint Bone Spine**, v. 69, n. 3, p. 252-5, May 2002. ISSN 1297-319X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102270> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

DA MOTA, L. M. et al. 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. **Advances in Rheumatology**, p. 1-17, May 2018. <<http://doi.org/10.1186/s42358-018-0005-0>>.

DANT, T. A. et al. T-cell expression of AhR inhibits the maintenance of pTreg cells in the gastrointestinal tract in acute GVHD. **Blood**, v. 130, n. 3, p. 348-359, 07 2017. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28550042>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

DARRAH, E. et al. Erosive rheumatoid arthritis is associated with antibodies that activate PAD4 by increasing calcium sensitivity. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 186, p. 186ra65, May 2013. ISSN 1946-6242. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23698378>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

DAYER, J. M. et al. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. **J Clin Invest**, v. 77, n. 2, p. 645-8, Feb 1986. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3003163>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

DE LAS CASAS-ENGEL, M. et al. Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. **J Immunol**, v. 190, n. 5, p. 2301-10, Mar 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355731>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

DELGADO, P. L. et al. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. **Arch Gen Psychiatry**, v. 47, n. 5, p. 411-8, May 1990. ISSN 0003-990X. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2184795>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

DENG, Y. et al. Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials. **Hum Immunol**, v. 78, n. 2, p. 120-128, Feb 2017. ISSN 1879-1166. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28040536>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

EBRINGER, A.; WILSON, C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. **J Med Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 305-11, Apr 2000. ISSN 0022-2615. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755623>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

EDELMAN, G. M.; KUNKEL, H. G.; FRANKLIN, E. C. Interaction of the rheumatoid factor with antigen-antibody complexes and aggregated gamma globulin. **J Exp Med**, v. 108, n. 1, p. 105-20, Jul 1958. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13549644>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

ELSHAZLI, R.; SETTIN, A. Association of PTPN22 rs2476601 and STAT4 rs7574865 polymorphisms with rheumatoid arthritis: A meta-analysis update. **Immunobiology**, v. 220, n. 8, p. 1012-24, Aug 2015. ISSN 1878-3279. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963842>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

ERNBERG, M. et al. Plasma and serum serotonin levels and their relationship to orofacial pain and anxiety in fibromyalgia. **J Orofac Pain**, v. 14, n. 1, p. 37-46, 2000. ISSN 1064-6655. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11203736>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

ESSER, C.; RANNUG, A. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 2, p. 259-79, 2015. ISSN 1521-0081. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25657351>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

EZAKI, I. et al. Human monoclonal rheumatoid factors augment arthritis in mice by the activation of T cells. **Clin Exp Immunol**, v. 104, n. 3, p. 474-82, Jun 1996. ISSN 0009-9104. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9099933>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

FAKHFOURI, G. et al. Impact of 5-HT₃ receptor antagonists on peripheral and central diseases. **Drug Discov Today**, v. 17, n. 13-14, p. 741-7, Jul 2012. ISSN 1878-5832. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390946>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

FALLARINO, F. et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. **Cell Death Differ**, v. 9, n. 10, p. 1069-77, Oct 2002. ISSN 1350-9047. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12232795>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. T cell apoptosis by kynurenines. **Adv Exp Med Biol**, v. 527, p. 183-90, 2003. ISSN 0065-2598. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15206731>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **J Immunol**, v. 176, n. 11, p. 6752-61, Jun 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709834>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

FATOKUN, A. A.; HUNT, N. H.; BALL, H. J. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: characteristics and potential roles in health and disease. **Amino Acids**, v. 45, n. 6, p. 1319-29, Dec 2013. ISSN 1438-2199. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24105077>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

FAVRE, D. et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 32, p. 32ra36, May 2010. ISSN 1946-6242. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484731>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

FERRAZ, M. B. et al. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. **J Rheumatol**, v. 17, n. 6, p. 813-7, Jun 1990. ISSN 0315-162X. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2388204>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

FIDALGO, S.; IVANOV, D. K.; WOOD, S. H. Serotonin: from top to bottom. **Biogerontology**, v. 14, n. 1, p. 21-45, Feb 2013. ISSN 1573-6768. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100172> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

FILIPPINI, P. et al. Emerging concepts on inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase in rheumatic diseases. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 31, p. 5381-93, 2012. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22963664> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356-61, May 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748655> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. The disease formerly known as rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 3, p. 114, 2014. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25167330> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 183-196, Feb 2017. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28228278> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

FRISELL, T. et al. Familial aggregation of arthritis-related diseases in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: a register-based case-control study in Sweden. **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 1, p. 183-9, Jan 2016. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498119> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 11, p. 2773-82, Nov 2013. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897126> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

FU, L. H. et al. Hypomethylation of proximal CpG motif of interleukin-10 promoter regulates its expression in human rheumatoid arthritis. **Acta Pharmacol Sin**, v. 32, n. 11, p. 1373-80, Nov 2011. ISSN 1745-7254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21986577> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

FUCHS, D. et al. Decreased serum tryptophan in patients with HIV-1 infection correlates with increased serum neopterin and with neurologic/psychiatric symptoms. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 3, n. 9, p. 873-6, 1990. ISSN 0894-9255. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2166783> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

FUJINAMI, R. S. et al. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 1, p. 80-94, Jan 2006. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418524> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

GABRIEL, S. E.; CROWSON, C. S.; O'FALLON, W. M. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 3, p. 415-20, Mar 1999. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10088762>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GAN, R. W. et al. Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. **J Rheumatol**, v. 42, n. 4, p. 572-9, Apr 2015. ISSN 0315-162X. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25593232>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GASSE, T. et al. Neopterin production and tryptophan degradation in acute Lyme neuroborreliosis versus late Lyme encephalopathy. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v. 32, n. 9, p. 685-9, Sep 1994. ISSN 0939-4974. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7865624>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GENEFKE, I. K.; GAREL, A.; MANDEL, P. Factors influencing free serotonin in human plasma. **Clin Chim Acta**, v. 20, n. 1, p. 61-7, Apr 1968. ISSN 0009-8981. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5652006>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GERSHON, M. D.; TACK, J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 397-414, Jan 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241888>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GHIA, J. E. et al. Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1649-60, Nov 2009. ISSN 1528-0012. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706294>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GILES, J. T. et al. Association of cross-reactive antibodies targeting peptidyl-arginine deiminase 3 and 4 with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98794, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24901704>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GIRBAL-NEUHAUSER, E. et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. **J Immunol**, v. 162, n. 1, p. 585-94, Jan 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886436>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GOLBABAPOUR, S.; ABDULLA, M. A.; HAJREZAEI, M. A concise review on epigenetic regulation: insight into molecular mechanisms. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 12, p. 8661-94, 2011. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22272098>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GOMEZ, A. et al. Loss of sex and age driven differences in the gut microbiome characterize arthritis-susceptible 0401 mice but not arthritis-resistant 0402 mice. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e36095, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553482>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

GONZALEZ, A. *et al.* Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor. **J Rheumatol**, v. 35, n. 6, p. 1009-14, Jun 2008. ISSN 0315-162X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18412312> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

GOODMAN, S. M.; CRONSTEIN, B. N.; BYKERK, V. P. Outcomes related to methotrexate dose and route of administration in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. **Clin Exp Rheumatol**, v. 33, n. 2, p. 272-8, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 0392-856X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536122> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 5, p. 249, 2009. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19835638> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

GOULIELMOS, G. N. *et al.* Genetic data: The new challenge of personalized medicine, insights for rheumatoid arthritis patients. **Gene**, v. 583, n. 2, p. 90-101, Jun 2016. ISSN 1879-0038. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26869316> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

GRANGER, B. *et al.* Performance of matrices developed to identify patients with early rheumatoid arthritis with rapid radiographic progression despite methotrexate therapy: an external validation study based on the ESPOIR cohort data. **RMD Open**, v. 2, n. 1, p. e000245, 2016. ISSN 2056-5933. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27252898> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 30, n. 11, p. 1205-13, Nov 1987. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2446635> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C.; QUINTANA, F. J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 19-33, Jan 2018. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29343438> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

HARRE, U. *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. **J Clin Invest**, v. 122, n. 5, p. 1791-802, May 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505457> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

HARRIS, M. L. *et al.* Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 7, p. 1958-67, Jul 2008. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18576335> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

HASHIZUME, M.; HAYAKAWA, N.; MIHARA, M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 11, p. 1635-40, Nov 2008. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786965> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

HAYER, S. et al. Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 1, p. 79-88, Jan 2007. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195210> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

HENSVOLD, A. H. et al. Environmental and genetic factors in the development of anticitrullinated protein antibodies (ACPAs) and ACPA-positive rheumatoid arthritis: an epidemiological investigation in twins. **Ann Rheum Dis**, v. 74, n. 2, p. 375-80, Feb 2015. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24276366> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

HOT, A. et al. IL-17 and tumour necrosis factor α combination induces a HIF-1 α -dependent invasive phenotype in synoviocytes. **Ann Rheum Dis**, v. 71, n. 8, p. 1393-401, Aug 2012. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22532631> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat Immunol**, v. 16, n. 5, p. 448-57, May 2015. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25898198> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ISHIDA, K. et al. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 83, n. 7, p. 917-25, Jul 2012. ISSN 1943-3670. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122521> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

JIANG, X. et al. To what extent is the familial risk of rheumatoid arthritis explained by established rheumatoid arthritis risk factors? **Arthritis Rheumatol**, v. 67, n. 2, p. 352-62, Feb 2015. ISSN 2326-5205. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418518> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

JOHANSSON, M. et al. PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 1, p. R19, 2006. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507117> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

JONNAKUTY, C.; GRAGNOLI, C. What do we know about serotonin? **J Cell Physiol**, v. 217, n. 2, p. 301-6, Nov 2008. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18651566> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

JUAREZ, M. et al. Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 6, p. 1099-107, Jun 2016. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160441> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KAMADA, N. *et al.* Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1325-9, Jun 2012. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22582016> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KAMINSKY, Z. A. *et al.* DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. **Nat Genet**, v. 41, n. 2, p. 240-5, Feb 2009. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151718> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KAROUZAKIS, E. *et al.* DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Genes Immun**, v. 12, n. 8, p. 643-52, Dec 2011. ISSN 1476-5470. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21753787> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KLARESKOG, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 1, p. 38-46, Jan 2006. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385494> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KLAVDIANOU, K. *et al.* Decreased Serotonin Levels and Serotonin-Mediated Osteoblastic Inhibitory Signaling in Patients With Ankylosing Spondylitis. **J Bone Miner Res**, v. 31, n. 3, p. 630-9, Mar 2016. ISSN 1523-4681. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26420546> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 10, p. 702-9, Sep 2000. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974135> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KLING, A. *et al.* Decreased density of serotonin 5-HT_{2A} receptors in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 65, n. 6, p. 816-9, Jun 2006. ISSN 0003-4967. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699051> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KOBAYASHI, S. *et al.* A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 9, p. 1317-22, Sep 2008. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617548> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KONIG, M. F. *et al.* Antibodies to native and citrullinated RA33 (hnRNP A2/B1) challenge citrullination as the inciting principle underlying loss of tolerance in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 11, p. 2022-2028, Nov 2016. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26865600> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KOPP, S.; ALSTERGREN, P. Blood serotonin and joint pain in seropositive versus seronegative rheumatoid arthritis. **Mediators Inflamm**, v. 11, n. 4, p. 211-7, Aug 2002. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12396472> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KRAAN, M. C. *et al.* Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 41, n. 8, p. 1481-8, Aug 1998. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704648> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KRISHNAMURTHY, A. *et al.* Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 4, p. 721-9, Apr 2016. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26612338> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KURKÓ, J. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 45, n. 2, p. 170-9, Oct 2013. ISSN 1559-0267. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23288628> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

KUSHNIR-SUKHOV, N. M. *et al.* 5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 6422-32, Nov 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056574> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LABADARIOS, D. *et al.* Metabolic abnormalities of tryptophan and nicotinic acid in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Rehabil**, v. 17, n. 4, p. 227-232, Nov 1978. ISSN 0300-3396. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/153576> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LAHOTI, T. S. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor antagonism attenuates growth factor expression, proliferation, and migration in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 348, n. 2, p. 236-45, Feb 2014. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309559> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LAM, J. *et al.* TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **J Clin Invest**, v. 106, n. 12, p. 1481-8, Dec 2000. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120755> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LAPIN, I. P.; OXENKRUG, G. F. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. **Lancet**, v. 1, n. 7586, p. 132-6, Jan 1969. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4178247> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LE FLOC'H, N.; OTTEN, W.; MERLOT, E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1195-205, Nov 2011. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20872026> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LEE, Y. H. *et al.* The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, n. 1, p. 49-56, Jan 2007.

ISSN 1462-0324. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760194> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LESCH, K. P.; GUTKNECHT, L. Pharmacogenetics of the serotonin transporter. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 6, p. 1062-73, Jul 2005. ISSN 0278-5846. Disponível em:
 <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951088> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LEÓN-PONTE, M.; AHERN, G. P.; O'CONNELL, P. J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. **Blood**, v. 109, n. 8, p. 3139-46, Apr 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em:
 < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158224> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LI, M. *et al.* The common, autoimmunity-predisposing 620Arg > Trp variant of PTPN22 modulates macrophage function and morphology. **J Autoimmun**, v. 79, p. 74-83, May 2017. ISSN 1095-9157. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28237724> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LI, N. *et al.* Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation. **Am J Pathol**, v. 178, n. 2, p. 662-71, Feb 2011. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281798> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LI, Q. *et al.* Tolerogenic Phenotype of IFN- γ -Induced IDO+ Dendritic Cells Is Maintained via an Autocrine IDO-Kynurenine/AhR-IDO Loop. **J Immunol**, v. 197, n. 3, p. 962-70, 08 2016. ISSN 1550-6606. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27316681> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LIU, C. C. *et al.* Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. **Immunol Lett**, v. 135, n. 1-2, p. 96-9, Mar 2011. ISSN 1879-0542. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937307> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LIU, H. *et al.* Reduced cytotoxic function of effector CD8+ T cells is responsible for indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent immune suppression. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 1022-31, Jul 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em:
 <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19564344> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LOUZADA-JUNIOR, P. *et al.* HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 2, p. 158-62, Feb 2001. ISSN 0001-2815. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11260512> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LOUZADA-JÚNIOR, P. *et al.* A majority of Brazilian patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1 alleles carry both the HLA-DRB1 shared epitope and anti-citrullinated peptide antibodies. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 6, p. 493-9, Jun 2008. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18560674> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LU, L. F. *et al.* Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. **Nature**, v. 442, n. 7106, p. 997-1002, Aug 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921386> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

LÖB, S. *et al.* Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 6, p. 445-52, Jun 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461669> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

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://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434571> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MACPHERSON, A. J. *et al.* The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 1, p. 11-22, Jan 2008. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079156> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MAKRYGIANNAKIS, D. *et al.* Citrullination is an inflammation-dependent process. **Ann Rheum Dis**, v. 65, n. 9, p. 1219-22, Sep 2006. ISSN 0003-4967. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540548> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 1, p. 60-75, 01 2017. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27916980> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MANCHES, O. *et al.* HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. **J Clin Invest**, v. 118, n. 10, p. 3431-9, Oct 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18776940> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MANTOVANI, A. *et al.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, Jul 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785456> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MARRACK, P.; KAPPLER, J.; KOTZIN, B. L. Autoimmune disease: why and where it occurs. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 899-905, Aug 2001. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479621> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MATSUMURA, Y. *et al.* A role for inflammatory mediators in the induction of immunoregulatory B cells. **J Immunol**, v. 177, n. 7, p. 4810-7, Oct 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982922> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MATTEOLI, G. *et al.* Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. **Gut**, v. 59, n. 5, p. 595-604, May 2010. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427394> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MAURER-SPUREJ, E.; PITTENDREIGH, C.; SOLOMONS, K. The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. **Thromb Haemost**, v. 91, n. 1, p. 119-28, Jan 2004. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691577> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MAVRAGANI, C. P. et al. Association of the response to tumor necrosis factor antagonists with plasma type I interferon activity and interferon-beta/alpha ratios in rheumatoid arthritis patients: a post hoc analysis of a predominantly Hispanic cohort. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 2, p. 392-401, Feb 2010. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112385> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MAWE, G. M.; HOFFMAN, J. M. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 8, p. 473-86, Aug 2013. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797870> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MCGRAW, W. T. et al. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. **Infect Immun**, v. 67, n. 7, p. 3248-56, Jul 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377098> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

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: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525752> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 389, n. 10086, p. 2328-2337, 06 2017. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28612747> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MCMICHAEL, A. J. et al. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 20, n. 5, p. 1037-42, Jun 1977. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/869952> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunol Today**, v. 20, n. 10, p. 469-73, Oct 1999. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500295> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 10, p. 762-74, Oct 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459668> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MENESES, A. 5-HT system and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 8, p. 1111-25, Dec 1999. ISSN 0149-7634. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643820> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MEZRICH, J. D. et al. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. **J Immunol**, v. 185, n. 6, p. 3190-8, Sep

2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720200> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MIAO, C. G. et al. New advances of microRNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, with a focus on the crosstalk between DNA methylation and the microRNA machinery. **Cell Signal**, v. 25, n. 5, p. 1118-25, May 2013. ISSN 1873-3913. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23385088> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MIHARA, M. et al. Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. **Br J Rheumatol**, v. 34, n. 4, p. 321-5, Apr 1995. ISSN 0263-7103. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7788145> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MIKULS, T. R. et al. Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 5, p. 1090-100, May 2014. ISSN 2326-5205. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782175> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MILLER, F. W. Environmental agents and autoimmune diseases. **Adv Exp Med Biol**, v. 711, p. 61-81, 2011. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21627043> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MILLER, F. W. et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. **J Autoimmun**, v. 39, n. 4, p. 259-71, Dec 2012. ISSN 1095-9157. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739348> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 1988. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MIMORI, T. et al. Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 16, p. 7267-71, Aug 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638179> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 10, p. 763-76, Oct 2012. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023676> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MIYARA, M. et al. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 12, p. 744-55, Oct 2011. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21621000> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MIYARA, M.; ITO, Y.; SAKAGUCHI, S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 9, p. 543-51, Sep 2014. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980140> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends Immunol**, v. 34, n. 3, p. 137-43, Mar 2013. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103127> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MUNN, D. H. *et al.* Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **J Exp Med**, v. 189, n. 9, p. 1363-72, May 1999. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224276> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 633-42, May 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894280> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, v. 297, n. 5588, p. 1867-70, Sep 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228717> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, v. 281, n. 5380, p. 1191-3, Aug 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712583> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MURRAY, M. F. The human indoleamine 2,3-dioxygenase gene and related human genes. **Curr Drug Metab**, v. 8, n. 3, p. 197-200, Apr 2007. ISSN 1389-2002. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430106> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MYDEL, P. *et al.* Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis. **J Immunol**, v. 184, n. 12, p. 6882-90, Jun 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488785> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MÜLLER, N. *et al.* Interleukin-6 and tumour necrosis factor- α differentially regulate lincRNA transcripts in cells of the innate immune system in vivo in human subjects with rheumatoid arthritis. **Cytokine**, v. 68, n. 1, p. 65-8, Jul 2014. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721042> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

MÜLLER, T. *et al.* 5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6453, Jul 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649285> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NELL-DUXNEUNER, V. *et al.* Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis: a follow-up study. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 1, p. 169-74, Jan 2010. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153104> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NEMAZEE, D. A. Immune complexes can trigger specific, T cell-dependent, autoanti-IgG antibody production in mice. **J Exp Med**, v. 161, n. 1, p. 242-56, Jan 1985. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578542> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NEWTON, J. L. *et al.* A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. **Genes Immun**, v. 5, n. 3, p. 151-7, May 2004. ISSN 1466-4879. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749714> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NGUYEN, N. T. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor antagonism and its role in rheumatoid arthritis. **J Exp Pharmacol**, v. 7, p. 29-35, 2015. ISSN 1179-1454. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186143> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NIE, H. *et al.* Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. **Nat Med**, v. 19, n. 3, p. 322-8, Mar 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396208> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NIEDERKORN, J. Y. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 3, p. 327-31, Jun 2008. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406591> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NIELEN, M. M. *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 2, p. 380-6, Feb 2004. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14872479> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NOACK, M.; MIOSSEC, P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. **Semin Immunopathol**, Feb 2017. ISSN 1863-2300. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28213794> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NOACK, M.; NDONGO-THIAM, N.; MIOSSEC, P. Interaction among activated lymphocytes and mesenchymal cells through podoplanin is critical for a high IL-17 secretion. **Arthritis Res Ther**, v. 18, p. 148, Jun 2016. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27338729> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

NOGUCHI, T.; NISHINO, M.; KIDO, R. Tryptophan 5-hydroxylase in rat intestine. **Biochem J**, v. 131, n. 2, p. 375-80, Feb 1973. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4541815> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

OKADA, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 376-81, Feb 2014. ISSN 1476-4687.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390342> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

OKEY, A. B.; RIDDICK, D. S.; HARPER, P. A. Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. **Trends Pharmacol Sci**, v. 15, n. 7, p. 226-32, Jul 1994. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7940984> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

OLIVEIRA, R. D. *et al.* Share epitope, citrullinated cyclic peptide antibodies and smoking in Brazilian rheumatoid arthritis patients. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 34, n. 1, p. 32-5, Feb 2008. ISSN 1559-0267. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18270855> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

OPITZ, C. A. *et al.* An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 478, n. 7368, p. 197-203, Oct 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976023> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

OSTA, B. *et al.* Effects of Interleukin-17A on Osteogenic Differentiation of Isolated Human Mesenchymal Stem Cells. **Front Immunol**, v. 5, p. 425, 2014. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228904> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

OXENKRUG, G. F. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1199, p. 1-14, Jun 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20633104> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PADYUKOV, L. *et al.* A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 2, p. 259-65, Feb 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156761> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 10, p. 3085-92, Oct 2004. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476204> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PALEGO, L. *et al.* Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. **J Amino Acids**, v. 2016, p. 8952520, 2016. ISSN 2090-0104. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26881063> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PALLOTTA, M. T. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nat Immunol**, v. 12, n. 9, p. 870-8, Sep 2011. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804557> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PARK, H. K. *et al.* Promoter polymorphism (-590, T/C) of interleukin 4 (IL4) gene is associated with rheumatoid arthritis: An updated meta-analysis. **Saudi J Biol Sci**, v.

24, n. 2, p. 444-449, Feb 2017. ISSN 1319-562X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28149185> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PAUL, B. J.; KANDY, H. I.; KRISHNAN, V. Pre-rheumatoid arthritis and its prevention. **Eur J Rheumatol**, v. 4, n. 2, p. 161-165, Jun 2017. ISSN 2147-9720. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28638695> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PEDERSEN, M. *et al.* Diet and risk of rheumatoid arthritis in a prospective cohort. **J Rheumatol**, v. 32, n. 7, p. 1249-52, Jul 2005. ISSN 0315-162X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996059> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PERKINS, M. N.; STONE, T. W. Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 226, n. 2, p. 551-7, Aug 1983. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6308211> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PETTIT, A. R. *et al.* TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. **Am J Pathol**, v. 159, n. 5, p. 1689-99, Nov 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696430> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PFEFFERKORN, E. R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. **J Interferon Res**, v. 6, n. 3, p. 267-79, Jun 1986. ISSN 0197-8357. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2427623> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PINCUS, T.; SOKKA, T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 17, n. 5, p. 753-81, Oct 2003. ISSN 1521-6942. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915156> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Quantitative clinical rheumatology: "keep it simple, stupid": MDHAQ function, pain, global, and RAPID3 quantitative scores to improve and document the quality of rheumatologic care. **J Rheumatol**, v. 36, n. 6, p. 1099-100, Jun 2009. ISSN 0315-162X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509086> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

POLLARD, K. M. Environment, autoantibodies, and autoimmunity. **Front Immunol**, v. 6, p. 60, 2015. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25717329> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PREVOO, M. L. *et al.* Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 38, n. 1, p. 44-8, Jan 1995. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7818570> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

PUC CETTI, P.; GROHMANN, U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 10, p.

817-23, Oct 2007. ISSN 1474-1741. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767193>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

QUINTANA, F. J. *et al.* Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 65-71, May 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362915> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

QUINTANA, F. J.; SHERR, D. H. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 4, p. 1148-61, 2013. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908379> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

RACKÉ, K. *et al.* Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. **Behav Brain Res**, v. 73, n. 1-2, p. 83-7, 1996. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788482> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

RANGEL-MORENO, J. *et al.* Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v. 116, n. 12, p. 3183-94, Dec 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143328> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

RATERMAN, H. G. *et al.* The interferon type I signature towards prediction of non-response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 2, p. R95, Apr 2012. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22540992> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

RAYCHAUDHURI, S. *et al.* Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. **Nat Genet**, v. 44, n. 3, p. 291-6, Mar 2012. ISSN 1546-1718. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286218>>. Acesso em: 01 mai. 2018.

REDDY, P. *et al.* Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 7, p. 2562-73, Jul 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568076> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

REDLICH, K. *et al.* Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. **J Clin Invest**, v. 110, n. 10, p. 1419-27, Nov 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438440> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

REICHERT, J. *et al.* Smoking cessation guidelines--2008. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 10, p. 845-80, Oct 2008. ISSN 1806-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19009219> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

REICHERT, S. *et al.* Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 6, p. 591-8, Jun 2013. ISSN 1600-051X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23534379> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

REYNISDOTTIR, G. *et al.* Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 1, p. 31-9, Jan 2014. ISSN 2326-5205. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449573> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ROBINSON, J. *et al.* The IMGT/HLA database. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Database issue, p. D1222-7, Jan 2013. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23080122> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ROOSNEK, E.; LANZAVECCHIA, A. Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. **J Exp Med**, v. 173, n. 2, p. 487-9, Feb 1991. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1703209> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ROSE, W. C. II. The sequence of events leading to the establishment of the amino acid needs of man. **Am J Public Health Nations Health**, v. 58, n. 11, p. 2020-7, Nov 1968. ISSN 0002-9572. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5748871> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

RUDDLE, N. H.; AKIRAV, E. M. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. **J Immunol**, v. 183, n. 4, p. 2205-12, Aug 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661265> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

RUDNICK, G. Structure/function relationships in serotonin transporter: new insights from the structure of a bacterial transporter. **Handb Exp Pharmacol**, n. 175, p. 59-73, 2006. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16722230> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

RUTELLA, S.; DANESE, S.; LEONE, G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1435-40, Sep 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684955> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SABHARWAL, U. K. *et al.* Activation of the classical pathway of complement by rheumatoid factors. Assessment by radioimmunoassay for C4. **Arthritis Rheum**, v. 25, n. 2, p. 161-7, Feb 1982. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7066047> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SAEVARSOTTIR, S. *et al.* Current smoking status is a strong predictor of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: results from the SWEFOT trial. **Ann Rheum Dis**, v. 74, n. 8, p. 1509-14, Aug 2015. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24706006> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Predictors of response to methotrexate in early DMARD naive rheumatoid arthritis: results from the initial open-label phase of the SWEFOT trial. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 3, p. 469-75, Mar 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149498> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? **Int Immunol**, v. 21, n. 10, p. 1105-11, Oct 2009. ISSN 1460-2377. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737784> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SCHEFOLD, J. C. *et al.* Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, n. 6, p. 1901-8, Jun 2009. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155537> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SCHELLEKENS, G. A. *et al.* Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. **J Clin Invest**, v. 101, n. 1, p. 273-81, Jan 1998. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421490> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 1, p. 155-63, Jan 2000. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643712> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SCHER, J. U.; LITTMAN, D. R.; ABRAMSON, S. B. Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. **Arthritis Rheumatol**, v. 68, n. 1, p. 35-45, Jan 2016. ISSN 2326-5205. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331579> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SCHER, J. U. *et al.* Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **Elife**, v. 2, p. e01202, Nov 2013. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192039> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SCHROECKSNADEL, K. *et al.* Increased degradation of tryptophan in blood of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 30, n. 9, p. 1935-9, Sep 2003. ISSN 0315-162X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12966593> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Tryptophan degradation increases with stage in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**, v. 25, n. 3, p. 334-7, May 2006. ISSN 0770-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261283> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SCHRÖCKSNADEL, K. *et al.* Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. **Clin Chim Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 82-90, Feb 2006. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139256> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SCHWARCZ, R. *et al.* Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 465-77, Jul 2012. ISSN 1471-0048.

Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678511> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094-108, Sep 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870100> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SEIDEL, M. F. *et al.* Serotonin mediates PGE2 overexpression through 5-HT2A and 5-HT3 receptor subtypes in serum-free tissue culture of macrophage-like synovial cells. **Rheumatol Int**, v. 28, n. 10, p. 1017-22, Aug 2008. ISSN 0172-8172. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18368410> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SEMĚNOV, M.; TAMAI, K.; HE, X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. **J Biol Chem**, v. 280, n. 29, p. 26770-5, Jul 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908424> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 213, n. 3, p. 561-74, Mar 2015. ISSN 1748-1716. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25439045> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SHARMA, M. D. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. **J Clin Invest**, v. 117, n. 9, p. 2570-82, Sep 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17710230> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SHEN, N. *et al.* Three single nucleotide polymorphisms of TNFAIP3 gene increase the risk of rheumatoid arthritis. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 20784-20793, Mar 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199970> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SHEVACH, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 6, p. 389-400, Jun 2002. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093005> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SHI, J. *et al.* Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 42, p. 17372-7, Oct 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21987802> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SHIGEYAMA, Y. *et al.* Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 11, p. 2523-30, Nov 2000. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083276> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SICA, A.; BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. **J Clin Invest**, v. 117, n. 5, p. 1155-66, May 2007. ISSN 0021-

9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476345> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 4 Suppl 3, p. S265-72, 2002. ISSN 1465-9905. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110146> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SIMMONS, P. S. *et al.* Increased proteolysis. An effect of increases in plasma cortisol within the physiologic range. **J Clin Invest**, v. 73, n. 2, p. 412-20, Feb 1984. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6365973> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SINGH, J. A. *et al.* 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 64, n. 5, p. 625-39, May 2012. ISSN 2151-4658. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473917> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

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://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156434> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SMOLEN, J. S. *et al.* A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42, n. 2, p. 244-57, Feb 2003. ISSN 1462-0324. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595618> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. **Ann Rheum Dis**, v. 76, n. 6, p. 960-977, Jun 2017. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28264816> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. **Ann Rheum Dis**, v. 73, n. 3, p. 492-509, Mar 2014. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24161836> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Are autoantibodies active players or epiphenomena? **Curr Opin Rheumatol**, v. 10, n. 3, p. 201-6, May 1998. ISSN 1040-8711. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9608322> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SOICHOT, M. *et al.* Identification of a variable number of tandem repeats polymorphism and characterization of LEF-1 response elements in the promoter of the IDO1 gene. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25470, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980470> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

STASTNY, P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 298, n. 16, p. 869-71, Apr 1978. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/147420> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

STEINER, G. *et al.* Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. **J Clin Invest**, v. 90, n. 3, p. 1061-6, Sep 1992. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1522214> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

STOLT, P. *et al.* Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 6, p. 1072-6, Jun 2010. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19966090> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SUNDRUD, M. S. *et al.* Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. **Science**, v. 324, n. 5932, p. 1334-8, Jun 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498172> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SUZUKI, A. *et al.* Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. **Nat Genet**, v. 34, n. 4, p. 395-402, Aug 2003. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12833157> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SUZUKI, M. *et al.* IL-6 and IL-1 synergistically enhanced the production of MMPs from synovial cells by up-regulating IL-6 production and IL-1 receptor I expression. **Cytokine**, v. 51, n. 2, p. 178-83, Aug 2010. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403707> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

SUZUKI, T. *et al.* PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61045, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23577190> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

TARDITO, S. *et al.* Indoleamine 2,3 dioxygenase gene polymorphisms correlate with CD8+ Treg impairment in systemic sclerosis. **Hum Immunol**, v. 74, n. 2, p. 166-9, Feb 2013. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200754> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

TAYLOR, M. W.; FENG, G. S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. **FASEB J**, v. 5, n. 11, p. 2516-22, Aug 1991. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1907934> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

TEDESCHI, S. K. *et al.* The relationship between fish consumption and disease activity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, Jun 2017. ISSN 2151-4658. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28635117> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Diet and Rheumatoid Arthritis Symptoms: Survey Results From a Rheumatoid Arthritis Registry. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 69, n. 12, p. 1920-1925, Dec 2017. ISSN 2151-4658. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28217907> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

TERNESSE, P. *et al.* Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **J Exp Med**, v. 196, n. 4, p. 447-57, Aug 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12186837> >. Acesso em: 01 mai. 2018. Acesso em: 01 mai. 2018.

THIEBLEMONT, N. *et al.* Human neutrophils in auto-immunity. **Semin Immunol**, v. 28, n. 2, p. 159-73, Apr 2016. ISSN 1096-3618. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27036091> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

TOH, M. L. *et al.* Role of interleukin 17 in arthritis chronicity through survival of synoviocytes via regulation of synovialin expression. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13416, Oct 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976214> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

TOO, C. L. *et al.* Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case-control study. **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 6, p. 997-1002, Jun 2016. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681695> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

TURESSON, C. *et al.* Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 29, n. 1, p. 62-7, Jan 2002. ISSN 0315-162X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11824973> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

TYCE, G. M. Origin and metabolism of serotonin. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 16 Suppl 3, p. S1-7, 1990. ISSN 0160-2446. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369709> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

UYTTENHOVE, C. *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Nat Med**, v. 9, n. 10, p. 1269-74, Oct 2003. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14502282> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VACCHELLI, E. *et al.* Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. **Oncoimmunology**, v. 3, n. 10, p. e957994, Nov 2014. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25941578> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VAN BAARSEN, L. G. *et al.* Gene expression profiling in autoantibody-positive patients with arthralgia predicts development of arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n.

3, p. 694-704, Mar 2010. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20131234> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VAN DEN BERG, W. B.; MCINNES, I. B. Th17 cells and IL-17 a--focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. **Semin Arthritis Rheum**, v. 43, n. 2, p. 158-70, Oct 2013. ISSN 1532-866X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157091> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VAN DER HELM-VAN MIL, A. H. et al. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 4, p. 1117-21, Apr 2006. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16572446> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VAN GAALEN, F. A. et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 7, p. 2113-21, Jul 2004. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15248208> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VAN GESTEL, A. M. et al. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. **Arthritis Rheum**, v. 39, n. 1, p. 34-40, Jan 1996. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546736> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VAN RIEL, P. L.; RENSKERS, L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 34, n. 5 Suppl 101, p. S40-S44, 2016 Sep-Oct 2016. ISSN 0392-856X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27762189> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VELDHOEN, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 106-9, May 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362914> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VIATTE, S. et al. Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response. **JAMA**, v. 313, n. 16, p. 1645-56, Apr 2015. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25919528> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VIS, M.; GÜLER-YÜKSEL, M.; LEMS, W. F. Can bone loss in rheumatoid arthritis be prevented? **Osteoporos Int**, v. 24, n. 10, p. 2541-53, Oct 2013. ISSN 1433-2965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775419> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VOGEL, C. F. et al. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 375, n. 3, p.

331-5, Oct 2008. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694728> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VOJDANI, A.; POLLARD, K. M.; CAMPBELL, A. W. Environmental triggers and autoimmunity. **Autoimmune Dis**, v. 2014, p. 798029, 2014. ISSN 2090-0422. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25610638> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

VOOG, U. et al. Progression of radiographic changes in the temporomandibular joints of patients with rheumatoid arthritis in relation to inflammatory markers and mediators in the blood. **Acta Odontol Scand**, v. 62, n. 1, p. 7-13, Feb 2004. ISSN 0001-6357. Available at: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15124777> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WADA, T. T. et al. Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 444, n. 4, p. 682-6, Feb 2014. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513290> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WALTHER, D. J.; BADER, M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 9, p. 1673-80, Nov 2003. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563478> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WANG, Y. et al. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nat Med**, v. 16, n. 3, p. 279-85, Mar 2010. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190767> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Leukotrienes mediate 5-hydroxytryptamine-induced plasma extravasation in the rat knee joint via CysLT-type receptors. **Inflamm Res**, v. 53, n. 2, p. 66-71, Feb 2004. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15021971> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WEGNER, N. et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 9, p. 2662-72, Sep 2010. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20506214> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WELLS, G. A. Patient-driven outcomes in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol Suppl**, v. 82, p. 33-8, Jun 2009. ISSN 0380-0903. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509328> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WELSING, P. M. et al. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 9, p. 2009-17, Sep 2001. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592361> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WERNER, E. R. *et al.* Tryptophan degradation in patients infected by human immunodeficiency virus. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v. 369, n. 5, p. 337-40, May 1988. ISSN 0177-3593. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3166737> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WEYAND, C. M. *et al.* The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 117, n. 10, p. 801-6, Nov 1992. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1416553> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WICKS, I. P.; ROBERTS, A. W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 1, p. 37-48, Jan 2016. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633290> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WIGERBLAD, G. *et al.* Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism. **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 4, p. 730-8, Apr 2016. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26613766> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WILLIAMS, R. O. Exploitation of the IDO Pathway in the Therapy of Rheumatoid Arthritis. **Int J Tryptophan Res**, v. 6, n. Suppl 1, p. 67-73, 2013. ISSN 1178-6469. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922504> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WILLIS, V. C. *et al.* Sputum autoantibodies in patients with established rheumatoid arthritis and subjects at risk of future clinically apparent disease. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 10, p. 2545-54, Oct 2013. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817979> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WING, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 271-5, Oct 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845758> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WING, K.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nat Immunol**, v. 11, n. 1, p. 7-13, Jan 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016504> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WIRLEITNER, B. *et al.* Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. **Eur J Clin Invest**, v. 33, n. 7, p. 550-4, Jul 2003. ISSN 0014-2972. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814390> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 10, p. 593-601, Oct 2014. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914698> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

WRIGHT, H. L. *et al.* Interferon gene expression signature in rheumatoid arthritis neutrophils correlates with a good response to TNFi therapy. **Rheumatology**

(Oxford), v. 54, n. 1, p. 188-93, Jan 2015. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25125592> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

XUE, Z. T. *et al.* An epigenetic mechanism for high, synergistic expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) by combined treatment with zebularine and IFN- γ : potential therapeutic use in autoimmune diseases. **Mol Immunol**, v. 51, n. 2, p. 101-11, Jun 2012. ISSN 1872-9142. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424783> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

XUZHU, G. *et al.* Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. **Ann Rheum Dis**, v. 71, n. 1, p. 129-35, Jan 2012. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953348> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

YADAV, V. K. *et al.* Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. **Nat Med**, v. 16, n. 3, p. 308-12, Mar 2010. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139991> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

_____. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. **Cell**, v. 135, n. 5, p. 825-37, Nov 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041748> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

YEUNG, A. W. *et al.* Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 129, n. 7, p. 601-72, Oct 2015. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26186743> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

YUAN, Y.; SHAO, W.; LI, Y. Associations between C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR and susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Rheumatol Int**, v. 37, n. 4, p. 557-569, Apr 2017. ISSN 1437-160X. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28175955> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ZELLER, J. *et al.* Serotonin content of platelets in inflammatory rheumatic diseases. Correlation with clinical activity. **Arthritis Rheum**, v. 26, n. 4, p. 532-40, Apr 1983. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6838676> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ZHANG, H. *et al.* TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. **Cell Res**, v. 20, n. 12, p. 1390-3, Dec 2010. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079648> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ZHU, L. *et al.* Synovial autoreactive T cells in rheumatoid arthritis resist IDO-mediated inhibition. **J Immunol**, v. 177, n. 11, p. 8226-33, Dec 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114500> >. Acesso em: 01 mai. 2018.

ANEXOS

Anexo A - Critérios de Classificação para AR ACR/EULAR 2010

A. Envolvimento articular: dor ou edema das articulações avaliadas [#] no exame físico ou sinovite detectada em exame complementar de imagem (**Total: 0-5 pontos**)

1 grande articulação ^{##}	0 ponto
2-10 grandes articulações	1 ponto
1-3 pequenas articulações ^{&} pelo menos com ou sem grandes articulações envolvidas	2 pontos
4-10 pequenas articulações pelo menos com ou sem grandes articulações envolvidas	3 pontos
>10 articulações (pelo menos 1 pequena articulação acometida)	5 pontos

[#] exceto interfalangeanas distais (IFDs), 1° carpo-metacarpianas e 1° metatarsfalangeana (MTF)
^{##} ombros, cotovelos, quadril, joelhos e tornozelos
[&] interfalangeanas proximais (IFPs), metacarpofalangeanas, 2-5 ° MTFs, 1° IFs e punhos

B. Sorologia: no mínimo um resultado de teste é necessário (**Total: 0-3 pontos**)

FR e antiCCP negativos [*]	0 ponto
FR positivo ou antiCCP positivo em baixos títulos ^{***}	2 pontos
FR positivo ou antiCCP positivo em altos títulos	3 pontos

^{*} valores menores ou iguais ao limite superior da normalidade (LSN) para o método
^{**} valores que são maiores que o LSN para o método, mas menor que 3 vezes, ou nos casos em que o resultado do FR é apenas positivo ou negativo
^{***} valores que são maiores que 3 vezes o LSN para o método

C. Reagentes de fase aguda: um resultado de teste é necessário (**Total 0-1 ponto**)

Proteína C reativa e VHS normais	0 ponto
Proteína C reativa ou VHS anormal	1 ponto

D. Duração dos sintomas: tempo informado pelo paciente desde início da sinovite nas articulações clinicamente envolvidas no momento da avaliação (**Total 0-1 ponto**)

< 6 semanas	0 ponto
≥ 6 semanas	1 ponto

- Os critérios deverão ser aplicados nos casos em que há no mínimo uma articulação com edema e que este não tenha sido melhor explicado por outra condição clínica.
- Escore de ≥ 6/10 é necessário para classificar o paciente como tendo AR

Anexo B - Critérios revisados do ACR 1987 para classificação da AR

Critério	Definição
1. Rigidez matinal	Rigidez matinal articular ou periarticular com duração de pelo menos uma hora até a melhora máxima.
2. Artrite em três ou mais áreas articulares	Edema de partes moles ou derrame articular (não proliferação óssea) presente simultaneamente e observado por um médico em IFPs proximais, punhos, MCFs, cotovelos, joelhos, tornozelos e MTFs, por no mínimo 6 semanas.
3. Artrite de articulações de mãos	Edema de punhos, MCPs ou IFPs por no mínimo 6 semanas.
4. Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo das mesmas áreas articulares (definida no item 2) de ambos os lados do corpo, por no mínimo 6 semanas (o envolvimento bilateral das IFPs, MCFs ou MTFs não necessita de simetria absoluta).
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutâneos sobre proeminências ósseas, superfícies extensoras ou região justa-articular observado por médico.
6. Fator reumatoide	Quantidades anormais (detectado por um método positivo em menos do que 5% dos controles normais).
7. Alterações radiográficas	Radiografias pósterio-anterior de mãos e punhos que devem mostrar inequívoca rarefação óssea periarticular ou erosões.

* No mínimo quatro critérios devem ser preenchidos para classificar como AR
 Pacientes com dois critérios clínicos não são excluídos

Fonte: Arnett et al (1988, Adaptado)

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes com Artrite Reumatoide

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome da Pesquisa: Análise do polimorfismo do gene da Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) em pacientes com artrite reumatoide.

Local da realização: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- SP

Pesquisadores responsáveis: Patrícia Rolim Mendonça Lôbo e Prof. Dr. Paulo Louzada Junior.

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar deste projeto de pesquisa. Esse convite está sendo feito a pacientes com Artrite Reumatoide atendidos nesse ambulatório. A participação é voluntária. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações. Se estiver interesse em participar, solicitaremos a assinatura deste documento, sendo garantido que você receberá uma via deste termo de consentimento assinada e com páginas rubricadas por você e pelo pesquisador.

Por que essa pesquisa está sendo feita? A artrite reumatoide é uma doença que causa impacto social, econômico e psicológico aos pacientes acometidos. Não se sabe ao certo a causa principal da doença. Há a hipótese de que células reguladoras que controlam a inflamação possam ter sua função prejudicada pela ação de uma enzima, a IDO1. A proposta de nossa pesquisa é identificar alterações genéticas que possam interferir na ação dessa enzima e verificar sua participação no quadro inflamatório da doença.

Como será feita essa pesquisa? Para analisarmos a participação da enzima IDO e do seu gene na Artrite Reumatoide, precisaremos coletar amostra de sangue dos pacientes portadores da doença. Assim, após ter concordado em participar do estudo e ter assinado esse termo de consentimento, cerca de 20 ml de sangue (o que corresponde aproximadamente a duas colheres de sopa) serão coletados por punção de uma veia do braço, semelhante à coleta realizada para exames de sangue. Além da coleta de sangue, aplicaremos um questionário sobre os sintomas atuais e sobre o impacto deles no seu dia a dia. Caso necessário, obteremos informações adicionais sobre o seu quadro clínico através da análise de seu

prontuário. Caso autorize, manteremos parte do material coletado (sangue e informações obtidas) armazenado para futuras análises, sendo garantido o sigilo e a privacidade de tais informações.

Quais os riscos que podem ocorrer? Com a coleta de sangue, podem ocorrer dor e formação de hematomas no local da punção venosa. A entrevista através da aplicação de questionários não causa estresse ou desconforto físico.

Quais as consequências de participar ou não da pesquisa? A recusa na participação da pesquisa não influenciará no seu atendimento nesse hospital, não gerando prejuízo algum a você. Caso você decida participar, isso não fará com que você compareça mais dias ao hospital, nem que tenha que realizar outros procedimentos além dos que já seriam necessários para o seu tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefícios nesse estudo? Não haverá despesas e nenhum ganho em dinheiro pela participação na pesquisa. Também não haverá nenhum privilégio ou prioridade em relação ao atendimento ambulatorial. O único benefício será o de nos auxiliar a entender melhor a participação da enzima IDO e do seu gene na artrite reumatoide, na tentativa de identificar algum novo exame que possa auxiliar no diagnóstico ou no tratamento da doença. Fica garantido que você terá acesso a informações referentes a sua participação neste estudo.

Afirmamos que todos os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Qualquer dúvida ética sobre essa pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 36022228. Outras dúvidas que possam surgir sobre a pesquisa poderão ser esclarecidas por Patrícia Rolim Mendonça Lôbo (médica reumatologista) pelo telefone: 16-36027159 ou 36027146.

Nome do sujeito da pesquisa ou responsável

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável

PATRICIA R. M. LÔBO
Nome do pesquisador
DATA: _____

Assinatura do pesquisador

Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para guarda de material biológico

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Eu, Dra. Patricia Rolim Mendonça Lôbo, juntamente com o Dr. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira e o Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior, do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, seremos os responsáveis pelo biorrepositório “*Biorrepositório de pacientes com artrite reumatoide*” criado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP). Este biorrepositório tem como objetivo guardar amostras de sangue (soro, plasma e DNA) com o intuito de extração de DNA genômico e posterior tipificação dos genes da indoleamine 2,3-dioxygenase 1 vinculado ao projeto de pesquisa ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE 1 (IDO1) EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE”. Gostaríamos de convidá-lo (a) a fornecer uma amostra de sangue para fins desta pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Este material será coletado durante a sua vinda ao hospital para consulta em um desses ambulatorios: de artrite reumatoide inicial (REUC), de doenças reumáticas (AIMU) ou no centro de medicamentos de alta complexidade (CEDMAC) do HCFMRP. Após coletado, o sangue será enviado ao laboratório de Imunologia molecular do HCFMRP, onde será extraído o DNA para análise do gene da IDO1 e depois armazenado em freezer a 2° a 8°C no “*Biorrepositório de pacientes com artrite reumatoide*” durante a execução desta pesquisa.

Eu, como responsável pela pesquisa, me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de sangue será identificada por meio de números e letras.

Quanto à coleta de material, será coletado 10ml de sangue (ou o equivalente a duas colheres de sopa) da veia do seu braço. Em decorrência da coleta de

sangue, o sr (a) poderá sentir a dor da picada da agulha e poderá aparecer uma mancha roxa que vai desaparecer com o passar dos dias. Para reduzir este risco ou desconforto, a coleta de sangue será realizada por profissional capacitado.

Solicitamos também os dados de contato do (a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse. Também solicitaremos novamente sua autorização para o descarte do material armazenado em decorrência de término da pesquisa ou para cada nova pesquisa com o seu sangue armazenado no biorrepositório, sendo que o novo projeto será enviado ao comitê de ética para análise e aprovação.

Dados do doador:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____, bairro _____, cidade
_____, telefone: _____

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que sua amostra de material biológico seja armazenada no “Biorrepositório de pacientes com artrite reumatoide”, criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para fins de pesquisa e análise científica.

Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada, será entregue ao senhor (a).

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, o(a) senhor(a) também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, que aprovou este biorrepositório, pelo telefone (16) 3602-2228.

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: Patricia Rolim Mendonça Lôbo

Telefone para contato: (16) 3602 2766/ (16) 36027159

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do participante (doador):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para voluntários saudáveis**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Nome da Pesquisa: Análise do polimorfismo do gene da Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) em pacientes com artrite reumatoide.

Local da realização: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- SP e Hospital Estadual de Ribeirão Preto-SP.

Pesquisadores responsáveis: Patrícia Rolim Mendonça Lôbo e Prof. Dr. Paulo Louzada Junior.

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar deste projeto de pesquisa. Esse convite está sendo feito a indivíduos saudáveis que serão atendidos nesse hospital. A participação é voluntária. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações. Se estiver interesse em participar, solicitaremos a assinatura deste documento, sendo garantido que você receberá uma via do termo de consentimento assinada e com páginas rubricadas por você e pelo pesquisador.

Por que essa pesquisa está sendo feita? A artrite reumatoide é uma doença que causa impacto social, econômico e psicológico aos pacientes acometidos. Não se sabe ao certo a causa principal da doença. Há a hipótese de que células reguladoras que controlam a inflamação possam ter sua função prejudicada pela ação de uma enzima, a IDO1. A proposta de nossa pesquisa é identificar alterações genéticas que possam interferir na ação dessa enzima e verificar sua participação no quadro inflamatório da doença.

Como será feita essa pesquisa? Para analisarmos a participação da enzima IDO e do seu gene na artrite reumatoide, precisamos analisá-los na amostra de sangue dos pacientes portadores da doença e compará-los ao sangue de indivíduos não portadores de artrite reumatoide. Assim, após ter obtido a informação da não existência de doenças, de ter concordado em participar do estudo e de ter assinado este termo de consentimento, cerca de 20 ml do seu sangue (o que corresponde aproximadamente a duas colheres de sopa) serão coletados por punção de uma veia do braço, semelhante à coleta realizada para exames de rotina. Caso autorize, manteremos parte do material coletado (sangue e informações) armazenado para futuras análises, sendo garantido o sigilo e a privacidade de tais informações.

Quais os riscos que podem ocorrer? Com a coleta de sangue, podem ocorrer dor e formação de hematomas no local da punção venosa. A entrevista não causa estresse ou desconforto físico.

Quais as consequências de participar ou não da pesquisa? A recusa na participação da pesquisa não influenciará no seu atendimento neste hospital, não gerando prejuízo algum a você. Caso você decida participar, isso não fará com que você compareça mais dias ao hospital, nem que tenha que realizar outros procedimentos, além dos que já seriam programados de acordo com o seu seguimento habitual.

Haverá alguma despesa ou benefícios nesse estudo?

Não haverá despesas e nenhum ganho em dinheiro pela participação na pesquisa. Também não haverá nenhum privilégio ou prioridade em relação aos atendimentos. O único benefício será o de nos auxiliar a entender melhor a participação da enzima IDO e do seu gene na artrite reumatoide, na tentativa de identificar algum novo exame que possa auxiliar no diagnóstico ou no tratamento da doença. Fica garantido que você terá acesso a informações referentes a sua participação neste estudo.

Afirmamos que todos os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Qualquer dúvida ética sobre essa pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 36022228. Outras dúvidas que possam surgir sobre a pesquisa poderão ser esclarecidas por **Patrícia Rolim Mendonça Lôbo (médica reumatologista)** pelo telefone: **16-36027159 ou 36027146.**

Nome do sujeito da pesquisa ou responsável

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável

PATRICIA R. M. LÔBO

Nome do pesquisador

Assinatura do pesquisador

DATA: _____

Anexo F - Ficha para coleta de dados

DISCIPLINA DE IMUNOLOGIA CLÍNICA DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA-FMRP-USP Ficha para coleta de dados

Nome: _____ Registro: _____ DN: ____/____/____ Sexo: _____
 Etnia : ☐ Caucasiana ☐ Afro-descendente ☐ Mulata ☐ Parda Est. Civil: _____ Profissão: _____
 Natural.: _____ Procedência: _____
 1º Atendimento na Reumatologia-HCRP: data ____/____/____ local: _____
 Data da coleta de dados clínicos: ____/____/____
 Data da coleta de amostra de sangue: ____/____/____
 Peso (kg) _____ Altura (cm) _____

CARACTERIZAÇÃO DIAGNÓSTICA

- 1- Duração dos sintomas (em meses): _____
- 2- Rigidez matinal: ☐ ausente ☐ 0-30 min ☐ 30-60 min ☐ > 60 min
- 3- Nódulo(s) reumatoide(s): ☐ ausente(s) ☐ presente(s)
- 4- Outra(s) manifestação(ões) extraarticular(es): _____
- 5- Articulações dolorosas _____ Articulações edemaciadas _____

- 6- Alterações radiográficas (mãos AP): ☐ osteopenia ☐ erosões ☐ outros
- 7- Fator reumatoide: _____ (IU/ml) Data da coleta: ____/____/____
- Anti-CCP : _____ (IU/ml) Data da coleta: ____/____/____
- 8- VHS (mm/h): _____ Data da coleta: ____/____/____
- PCR(mg/dl): _____ Data da coleta: ____/____/____
- 9- EVA ("Como você se sente em relação à sua artrite?"): _____ 0 _____ 100 mm

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

- ☐ ACR 1987: ____/____/____ (diagnóstico a partir de 4/7)
☐ ACR/EULAR 2010: _____ (> = 6 PONTOS)

ANTECEDENTES

- 1- Tabagismo: ☐ ex-fumante ☐ ativo (maços/ano: _____) ☐ nunca _____
- 2- ☐ Osteoporose ☐ Diabetes ☐ Hepatopatia ☐ Nefropatia ☐ HAS ☐ Infecções
- 3- Outros: _____

MEDICAÇÕES EM USO PARA ARTRITE REUMATOIDE

- ☐ Sem tratamento
- ☐ AINES – tempo de uso _____ ☐ Prednisona: dose _____ tempo _____
- ☐ Metotrexato: _____ tempo _____ ☐ Leflunomida: _____ tempo _____
- ☐ Biológicos: qual _____ dose _____ tempo de uso _____

CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL - avaliação pelo HAQ (vide anexo G) : _____

CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA DOENÇA

☐ Valor do DAS-28 PCR: _____ ☐ Valor do DAS-28 VHS: _____

☐ Remissão (<2,6) ☐ Baixa (2,6 -3,2) ☐ Moderada (3,3- 5,1) ☐ Alta (> 5,1)

$$\text{DAS28} = 0.56 \times \sqrt{\text{TJC28}} + 0.28 \times \sqrt{\text{SJC28}} + 0.70 \times \log_{\text{nat}}(\text{VHS}) + 0.014 \times \text{SG}$$

Anexo G - Questionário de Avaliação da saúde (do inglês, *Health Assessment Questionnaire, HAQ*)

Você é capaz de:	Nível de dificuldade			
	SEM QUALQUER	COM ALGUMA	COM MUITA	INCAPAZ DE FAZER
1- Vestir-se, inclusive amarrar os cadarços dos sapatos e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2 - Lavar sua cabeça e seus cabelos?	0	1	2	3
3 - Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braço?	0	1	2	3
4 - Deitar-se e levantar-se da cama?	0	1	2	3
5 - Cortar um pedaço de carne?	0	1	2	3
6 - Levar à boca um copo ou uma xícara cheia de café, leite ou água?	0	1	2	3
7 - Abrir um saco de leite comum?	0	1	2	3
8 - Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9 - Subir 5 degraus?	0	1	2	3
10 - Lavar e secar seu corpo após o banho?	0	1	2	3
11 - Tomar banho de chuveiro?	0	1	2	3
12 - Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13 - Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 kg, que está posicionado pouco acima da cabeça?	0	1	2	3
14 - Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15 - Segurar-se em pé no ônibus ou metrô?	0	1	2	3
16 - Abrir potes ou vidros de conservas, que tenham sido previamente abertos?	0	1	2	3
17 - Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18- Fazer compras nas redondezas onde mora?	0	1	2	3
19 - Entrar e sair de um ônibus?	0	1	2	3
20-Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	0	1	2	3

Escores dos componentes:

Anexo H - Parecer de aprovação no CEP do HCFMRP-USP para realização da pesquisa

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

Ribeirão Preto, 25 de novembro de 2015

Ofício nº 4235/2015
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE 1 (IDO 1) EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE” – versão 2, de 22/10/2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 418ª Reunião Ordinária realizada em 23/11/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes – versão 2, de 22/10/2015**, o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controle – versão 2, de 22/10/2015**, a **Criação do Biorrepositório e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para guarda de material biológico**, de acordo com o Processo HCRP nº 11566/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^ª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
PATRÍCIA ROLIM MENDONÇA LÔBO
PROF.DR. PAULO LOUZADA JUNIOR(Orientador)
Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16)3602-2228/cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo I - Parecer de aprovação no CEP do HERP para realização da pesquisa

Ribeirão Preto, 09 de dezembro de 2015.

Projeto de Pesquisa: "ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE 1 (IDO 1) EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE".

Pesquisador Principal: Patrícia Rolim Mendonça Lôbo

Contatos: 16 3602-2766 ou 16 3602-7159

E-mail: patriciarolim@yahoo.com.br

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior

Área de especialização: PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP

Fica autorizada a realização da pesquisa supracitada nas dependências do **HOSPITAL ESTADUAL DE RIBEIRÃO PRETO**, a partir do momento que forem entregues, na secretaria da administração, os documentos abaixo relacionados:

(x) parecer com APROVAÇÃO do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRPUSP
() outros

O pesquisador está ciente que não haverá financiamento, por parte do HERibeirão, para quaisquer materiais que não sejam de uso habitual desta Instituição, incluindo bens de consumo e equipamentos.

O Pesquisador também declara estar ciente e plenamente de acordo com a determinação da Diretoria do Hospital Estadual de Ribeirão Preto que estabelece que, todo e qualquer material e/ou equipamento trazidos para utilização nas dependências do hospital deverão ser previamente entregues para esterilização ou avaliação na Central de Material e Esterilização do HERibeirão, depois de acordado com a Enfermeira responsável pelo setor.

O Pesquisador se compromete em encaminhar a esta Diretoria o Relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados bem como comunicar qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Patrícia Rolim Mendonça Lôbo
Pesquisador Principal

Prof. Dra Maria de Fátima G. S. Tazima
Diretor Acadêmico e de Pesquisas de
Áreas Cirúrgicas