



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NEIDE TOMIMURA COSTA

**INFLUÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA E DAS  
MEDICAÇÕES MODIFICADORAS DO CURSO DA DOENÇA  
NO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

NEIDE TOMIMURA COSTA

**INFLUÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA E DAS  
MEDICAÇÕES MODIFICADORAS DO CURSO DA DOENÇA  
NO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Isaias Dichi.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Costa, Neide Tomimura.

Influência da síndrome metabólica e das medicações modificadoras do curso da doença no estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com artrite reumatoide / Neide Tomimura Costa. - Londrina, 2017.  
110 f. : il.

Orientador: Isaias Dichi.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. artrite reumatoide - Tese. 2. estresse oxidativo e nitrosativo - Tese. 3. síndrome metabólica - Tese. 4. medicações modificadoras do curso da doença - Tese. I. Dichi, Isaias. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

NEIDE TOMIMURA COSTA

**INFLUÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA E DAS MEDICAÇÕES  
MODIFICADORAS DO CURSO DA DOENÇA NO ESTRESSE  
OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM ARTRITE  
REUMATOIDE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Isaias Dichi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Vinícius Daher Alvares Delfino  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de novembro de 2017.

Dedico este trabalho ao amor da minha vida, meu marido Marcus. Por todo apoio, o tempo todo, de todas as formas.

E ao meu outro grande amor da vida, presente divino, minha filha Gabriela.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Deus por me abençoar em todos os sentidos, especialmente dando as condições para que eu pudesse concluir esta importante jornada.

Aos meus pais, que se sacrificaram para que eu pudesse me tornar médica. À minha querida irmã Célia, que sempre me apoiou.

Ao meu marido e minha filha, que participaram em todos os momentos da pós-graduação, com incentivo, carinho e todo o tipo de ajuda. Sem vocês eu não conseguiria!

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Isaias Dichi, por me receber em seu grupo de pesquisa, por estar sempre de bom humor, por ter muita paciência e por ser sempre muito educado, ainda que eu trocasse as referências repetidas vezes; e sobretudo, pela valiosa orientação no trabalho acadêmico.

À querida Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão, pessoa a quem admiro muito pela sua garra, determinação, inteligência, integridade e capacidade de fazer muitas coisas ao mesmo tempo. Grande amiga, muito obrigada por ter me incentivado desde o início do mestrado até a conclusão deste doutorado.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Aplicada pela valiosa ajuda, desde a coleta do material biológico, realização dos exames, montagem do banco de dados até a escrita dos artigos, em especial às doutorandas Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda, Daniela Frizon Alfieri e Bruna Miglioranza Scavuzzi.

À equipe de docentes e residentes da reumatologia, pela compreensão e apoio neste período em que tive menor dedicação ao setor.

À Universidade Estadual de Londrina, onde eu tive toda a minha formação desde a graduação e onde trabalho hoje, com muito orgulho. Agradeço especialmente aos professores doutores da Pós-graduação, que se empenham em produzir trabalhos de alta qualidade e elevam o conceito desta instituição.

Finalmente, agradeço aos pacientes do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina pela sua participação no projeto. Entendo que a imensa maioria compareceu com o intuito único de colaborar, seja com a pesquisa, com a equipe ou com o HU, mesmo sabendo que talvez não usufruam dos benefícios que esta pesquisa possa trazer.

Com toda sinceridade, muito obrigada!!!

COSTA, NT. **Influência da síndrome metabólica e das medicações modificadoras do curso da doença no estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com artrite reumatoide.** 2017. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2017.

## RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica que se caracteriza pelo acometimento crônico de articulações sinoviais. A síndrome metabólica (SM) é considerada uma comorbidade da AR e está associada ao aumento da mortalidade por doença cardiovascular. A patogênese da AR está intimamente relacionada ao estresse oxidativo e nitrosativo. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são importantes na sinalização molecular intracelular, aumentam a proliferação e resposta de células do sistema imune na membrana sinovial e podem danificar componentes da matriz cartilaginosa. Nas duas últimas décadas, houve uma mudança no perfil de comorbidades e diminuição das sequelas articulares para os pacientes, devido ao uso de novos fármacos, muito eficazes, com alvos terapêuticos bem definidos. Contudo, a SM, que está associada a piora da atividade da doença e do desequilíbrio redox, continua a ser muito prevalente na AR. Há necessidade de biomarcadores que possam identificar quais são os pacientes que poderiam beneficiar-se do uso precoce de fármacos biológicos ou de uma estratégia mais agressiva de tratamento baseado em metas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da SM e das medicações modificadoras do curso da doença (MMCD) nos biomarcadores do estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com AR. Foram realizados dois trabalhos: o primeiro consistiu em revisão de literatura em busca de artigos científicos publicados nas principais bases de dados, sobre a influência das MMCD no estresse oxidativo em pacientes com AR, sem limite de datas de publicação. Foram incluídos 15 estudos no artigo de revisão da literatura. Os resultados com metotrexato (MTX) e leflunomida apresentaram resultados semelhantes, com redução do óxido nítrico (NO). Os estudos com tocilizumabe verificaram acentuada diminuição de ERO e ERN. Na maioria dos estudos que utilizaram o infliximabe, houve diminuição da oxidação proteica, avaliada por meio de proteínas carbonílicas (PC). Os resultados mais relevantes se verificaram no aumento das defesas antioxidantes mostrados através de vários marcadores individuais e sistemas antioxidantes. O único estudo com etanercepte mostrou resultados muito semelhantes aos obtidos com estudo com MTX, com diminuição da pentosidina e do dano oxidativo ao DNA. Os resultados da maioria dos estudos relacionados neste trabalho mostraram uma melhora no estado redox, seja pela diminuição nos marcadores de oxidação ou pelo incremento na capacidade antioxidante ou ambos. Esta melhora no estado redox pode estar relacionada com o sucesso da terapêutica. O segundo trabalho envolveu a participação de 177 pacientes com AR e 150 controles. Foram avaliados os seguintes parâmetros laboratoriais: produtos avançados da oxidação proteica (AOPP), metabólitos do óxido nítrico (NOx), PC, *Total radical trapping antioxidant parameter* (TRAP), ácido úrico (AU) e proteína C reativa (PCR). Os resultados mostraram que os NOx e o índice zNOx / TRAP (diferença entre o escore z de NOx e o escore z de TRAP) foram significativamente aumentados na AR, enquanto que não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de AOPP, AU e TRAP entre os dois grupos. O tratamento com leflunomida foi associado a níveis aumentados de PC e com níveis diminuídos de TRAP e AU, enquanto o índice NOx / TRAP aumentou ainda mais. Os NOx e o índice NOx / TRAP foram significativamente maiores nas mulheres do que nos homens, enquanto a TRAP e o AU foram significativamente menores nas mulheres. A SM foi acompanhada por níveis aumentados de AOPP e AU. A AR foi melhor predita pelo aumento do índice NOx / TRAP, PCR e índice de massa corpórea. Conclusões: nossos dados demonstram que o metabolismo do NO, e não o dano oxidativo de proteínas ou de lipídios, está fortemente associado à fisiopatologia da AR. Portanto, o metabolismo do NO e a óxido nítrico sintetase

induzível podem se tornar novos alvos terapêuticos na AR. Além disso, a presença de SM e a diminuição dos níveis de AU pela leflunomida parecem favorecer o desequilíbrio redox em pacientes com AR. São necessários mais estudos para avaliar o impacto da redução da capacidade antioxidante na progressão da AR.

**Palavras-Chave:** Artrite Reumatoide. Síndrome metabólica. medicações modificadoras do curso da doença. Espécies reativas de oxigênio. Espécies reativas de nitrogênio. Inflamação. Leflunomida. Estresse oxidativo e nitrosativo.

COSTA, NT. **Influence of metabolic syndrome and disease-modifying antirheumatic drugs on oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis.** 2017. 110 pp. Doctoral dissertation (Doctoral degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2017.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic disease characterized by chronic involvement of synovial joints. Metabolic syndrome (MetS) is considered a comorbidity of RA and is associated with increased mortality from cardiovascular disease. The pathogenesis of RA is closely related to oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are important in intracellular molecular signaling, increase the proliferation and response of immune system cells in the synovial membrane and can damage components of the cartilaginous matrix. In the last two decades, there has been a change in the profile of comorbidities and a decrease in joint sequelae for patients due to the use of very effective new drugs with well-defined therapeutic targets. However, MetS, which is associated with worsening disease activity and redox imbalance, remains very prevalent in RA. There is a need for biomarkers that can identify which patients could benefit from the early use of biological drugs or a more aggressive goal-based treatment strategy. The objective of the present study was to evaluate the influence of metabolic syndrome and disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) on oxidative and nitrosative stress biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. Two studies were carried out: the first one consisted of a review of the literature in search of scientific papers published in the main data bases about the influence of the DMARD on oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis, with no publication deadlines. Fifteen studies were included in the literature review article. The results with methotrexate and leflunomide presented similar results, with reduction of nitric oxide (NO). Studies with tocilizumab found a marked decrease in ROS and RNS. In most of the studies that used infliximab, there was a decrease in protein oxidation, evaluated by means of carbonyl proteins (CP). The most remarkable results were observed in the increase of the antioxidant defenses shown through several individual markers and antioxidant systems. The only study with etanercept showed very similar results to those obtained with MTX, with decreased pentosidine and oxidative damage to DNA. The results of most studies reported in this work showed an improvement in the redox state, either by the decrease in the oxidation markers or by the increase in antioxidant capacity or both. This improvement in the redox state may be related to the success of the therapy. The second study involved the participation of 177 RA patients and 150 control subjects. The following laboratory parameters were evaluated: lipid hydroperoxides, advanced oxidation protein products (AOPP), nitric oxide metabolites (NOx), CP, total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), uric acid (UA) and C-reactive protein (CRP). The results showed that NOx and the NOx/TRAP ratio (difference between z score of NOx and z score of TRAP) were significantly increased in RA, whilst no significant differences in the lipid hydroperoxides, AOPP, AU and TRAP between both groups were verified. Treatment with leflunomide was associated with increased levels of CP and lowered levels of TRAP and UA, whilst the NOx/TRAP ratio further increased. NOx and NOx/TRAP ratio were significantly higher in women than in men, whilst TRAP and UA were significantly lower in women. MetS was accompanied by increased AOPP and UA levels. RA was better predicted by increasing NOx/TRAP ratio, CRP and body mass index. In conclusion, our data demonstrated that NOx and NOx/TRAP are strongly associated with RA physiopathology. Our findings suggest that inhibition of inducible nitric oxide synthase may become an interesting therapeutic approach for the treatment of RA. In addition, the presence of MetS and decrease in levels of UA by leflunomide favor redox imbalance in RA patients. More studies are needed to evaluate the impact of antioxidant capacity reduction on RA progression.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis. metabolic syndrome. Disease-modifying antirheumatic drugs. Reactive oxygen species. Reactive nitrogen species. Inflammation. Leflunomide. oxidative stress. Nitrosative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Patogênese da Artrite Reumatoide .....	18
Figura 2 – Fluxograma para Tratamento Medicamentoso da Artrite Reumatoide .....	23
Figura 3 - Geração de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio e Dano Celular .....	30
Figura 4 - Regulação das Vias do HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor) e fator nuclear- κB por ERO e Estimulação por Citocinas.....	35
Figura 5 - Via de Síntese das Purinas.....	38
<b>Artigo 1 - Influence of Disease-Modifying Antirheumatic Drugs on Oxidative and Nitrosative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis</b>	
Figura 1 - Generation of reactive oxygen and nitrogen species and antioxidant systems .....	66
Figura 2 - Pathogenesis of rheumatoid arthritis and therapeutic targets.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Critérios de classificação do ACR/EULAR 2010 para artrite reumatoide.....	20
<b>Tabela 2</b> - Classificação da Atividade da Doença de Acordo com os Critérios Propostos pelo <i>Disease Activity Score 28</i> (DAS 28) .....	21
<b>Tabela 3</b> – Marcadores do Estresse Nitro-oxidativo .....	32
<b>Artigo 1</b> - <b>Influence of Disease-Modifying Antirheumatic Drugs on Oxidative and Nitrosative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis</b>	
<b>Tabela 1</b> - Most commonly used oxidative and nitrosative stress markers .....	68
<b>Tabela 2</b> - Effects of synthetic (MTX and LEF) and biological (TCZ) disease-modifying antirheumatic drugs on nitro-oxidative stress in humans.....	69
<b>Tabela 3</b> - Effects of biological (TNF- $\alpha$ inhibitors) disease-modifying antirheumatic drugs on nitro-oxidative stress in humans.....	70
<b>Artigo 2</b> - Metabolic Syndrome and the Decreased Levels of Uric Acid by Leflunomide Favor Redox Imbalance in Patients with Rheumatoid Arthritis	
<b>Tabela 1</b> - Socio-demographic, clinical and biomarkers data in healthy controls (HC) and patients with Rheumatoid Arthritis (RA) .....	91
<b>Tabela 2</b> - Results of multivariate General Linear Model (GLM) analysis with the oxidative and nitrosative stress biomarkers as dependent variables and drug, metabolic syndrome (MetS), age, sex and body mass index (BMI) as explanatory variables. ....	92
<b>Tabela 3</b> - Estimated marginal means (SE) of the oxidative and nitrosative biomarkers obtained by multivariate General Linear Model (GLM) analysis, table 2. All data are expressed as z-scores.....	93
<b>Tabela 4</b> - Results of two different logistic regression analysis with Rheumatoid Arthritis as dependent variable. ....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADA	Adenosina desaminase
AICAR T'ase	5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
anti-CCP	<i>Anti-cyclic Citrullinated Peptid</i> (Anticorpo anti-peptídeo citrulinado)
AOPP	<i>Advanced Oxidation Protein Products</i> (Produtos avançados de oxidação proteica)
APC	<i>Antigen presenting cells</i> (Células apresentadoras de antígeno)
AR	Artrite reumatoide
AU	Ácido úrico
CAT	Catalase
CL-LOOH	<i>Tert-butyl Hydroperoxide-initiated Chemiluminescence</i> (Hidroperóxidos lipídicos iniciados por tert-butil avaliados por quimioluminescência)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> (Antígeno 4 do linfócito T citotóxico)
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados ao dano)
DAS 28	<i>Disease Activity Score 28</i> (escore de atividade da doença de 28 articulações)
DCV	Doenças cardiovasculares
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DMARD	<i>Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs</i> (Drogas modificadoras da doença)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzimaimunoensaio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FDA	<i>Food &amp; Drug Administration</i>

FR	Fator reumatoide
GLM	<i>General Linear Model</i> (Modelo Linear Generalizado)
GPx	Glutaciona peroxidase
GRd	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteínas séricas de alta densidade
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor-1<math>\alpha</math></i> (fator 1 $\alpha$ induzível por hipóxia)
HNE	<i>4-hydroxy-2-nonenal</i> (4-hidroxinonenal)
HPLC	<i>High performance lipid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
IFD	Interfalangeanas distais
IFP	Interfalangeanas proximais
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
JAK	Tirosina Janus quinase
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i> (Jun N-terminal quinase)
MCF	Metacarpofalangeanas
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
MMCD	Medicações modificadoras do curso da doença
MPO	Mieloperoxidase
MPP	Metaloproteases da matriz
MTF	Metatarsofalangeanas
MTX	Metotrexato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NE	Elastase de neutrófilos
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i> (Rede extracelular de neutrófilo)
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear- <i>kappa</i> B
NO	<i>Nitric oxide</i> (óxido nítrico)
OH $\cdot$	Hidroxil
OPG	Osteoprotegerina
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio 1
PAMP	<i>Pathogen-associated microbial patterns</i> (padrões moleculares associados a patógenos)

PCR	Proteína C reativa
QL	Quimioluminescência
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i> (Receptor ativador do fator nuclear kappa B)
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i> (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B)
ROM	<i>Reactive oxygen metabolites</i> (metabólitos reativos do oxigênio)
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
SSZ	Sulfassalazina
TCR	Receptor de célula T
TLR	<i>Toll like receptors</i> (Receptores do Tipo Toll)
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	<i>Total radical trapping antioxidant parameter</i> (Capacidade antioxidante total do plasma)
VHS	Velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1	ARTRITE REUMATOIDE .....	16
1.1.1	Epidemiologia, Etiologia e Genética .....	16
1.1.2	Fisiopatologia da AR .....	16
1.1.3	Manifestações Clínicas e Laboratoriais .....	19
1.1.4	Avaliação da Atividade da Doença e Definição do Alvo de Tratamento.....	21
1.1.5	Tratamento.....	22
1.1.5.1	Tratamento medicamentoso.....	22
1.1.5.2	Medicações modificadoras do curso da doença (MMCD) sintéticos convencionais .....	24
1.1.5.3	MMCD Sintéticos Alvo: Tofacitinibe.....	25
1.1.5.4	MMCD Biológicas.....	25
1.2	SÍNDROME METABÓLICA E AR.....	27
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO .....	28
1.3.1	Conceito.....	28
1.3.2	Marcadores do Estresse Oxidativo e Nitrosativo .....	30
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E AR .....	33
1.5	ÁCIDO ÚRICO E SUA RELAÇÃO COM ESTRESSE OXIDATIVO, SM E AR .....	35
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
	Objetivo geral.....	40
	Objetivos específicos .....	40
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>41</b>
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	41
4.2	POPULAÇÃO.....	41
4.2.1	Critérios de Inclusão .....	41
4.2.2	Critérios de Exclusão .....	41
4.3	DETERMINAÇÕES ANTROPOMÉTRICAS .....	42
4.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS .....	42
4.5	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	43

4.5.1	Capacidade Antioxidante Total Plasmática .....	43
4.5.2	Determinações de Produtos Avançados da Oxidação Proteica (AOPP).....	44
4.5.3	Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos Iniciados por Terc-butil (CL-LOOH).....	44
4.5.4	Proteínas carbonílicas.....	44
4.5.5	Metabólitos do NO (NOx) .....	45
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	<b>RESULTADOS</b> .....	46
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	95
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	97
	<b>APÊNDICE A</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	103
	<b>APÊNDICE B</b> - Ficha de Avaliação dos Pacientes com Artrite Reumatoide .....	105
	<b>ANEXO A</b> - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.....	107
	<b>ANEXO B</b> – Avaliação do <i>Disease Activity Score 28 Joints</i> .....	109
	<b>ANEXO C</b> – Avaliação da Saúde Global pelo Paciente.....	110

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ARTRITE REUMATOIDE

Artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica crônica, caracterizada pelo acometimento poliarticular e simétrico de articulações sinoviais, principalmente mãos e pés. Tem caráter crônico e progressivo, com potencial incapacitante devido às sequelas articulares e com diminuição da sobrevida pelo aumento do risco cardiovascular decorrente da inflamação sistêmica crônica (MCINNES; SCHETT, 2011).

#### 1.1.1 Epidemiologia, Etiologia e Genética

Atinge mais mulheres do que homens na proporção 2 a 3 para um e a prevalência é de cerca de 1% da população adulta. A incidência varia entre 16,5 e 38 casos por 100.000 habitantes (MYASOEDOVA et al., 2010).

Sua etiologia não está totalmente esclarecida. Entende-se que fatores ambientais num indivíduo geneticamente susceptível podem desencadear a doença. Dentre os fatores ambientais, o tabagismo é o fator de risco mais bem estabelecido. Outros, como exposição à sílica, óleos minerais, carvão, agentes infecciosos como vírus Epstein-Baar, citomegalovírus, espécies de *Proteus*, *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis* têm sido descritos (MCINNES; SCHETT, 2011).

O risco genético da AR é estimado em 40-65% para a doença soropositiva e em 20% para a soronegativa. A presença do epítipo compartilhado (alelos que contém a sequência de aminoácidos QKRAA na região do HLA-DRB1) confere particular susceptibilidade.

#### 1.1.2 Fisiopatologia da AR

A hipótese aceita atualmente é a de que o gatilho ambiental (tabagismo, bactérias ou partículas de sílica ou poeira) entraria por uma mucosa (gengivas, pulmões ou intestino), desencadeando uma resposta imune celular inata, ativando neutrófilos, células dendríticas imaturas e macrófagos, que dão início à inflamação e produção de autoantígenos, como as proteínas citrulinadas. Os antígenos citrulinados são processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APC) às células T, que são ativadas e, por sua vez, ativam a célula B, levando à produção de autoanticorpos (CATRINA et al., 2016). Ao longo do tempo, a concentração e a diversidade de epítipos dos autoanticorpos contra peptídeos

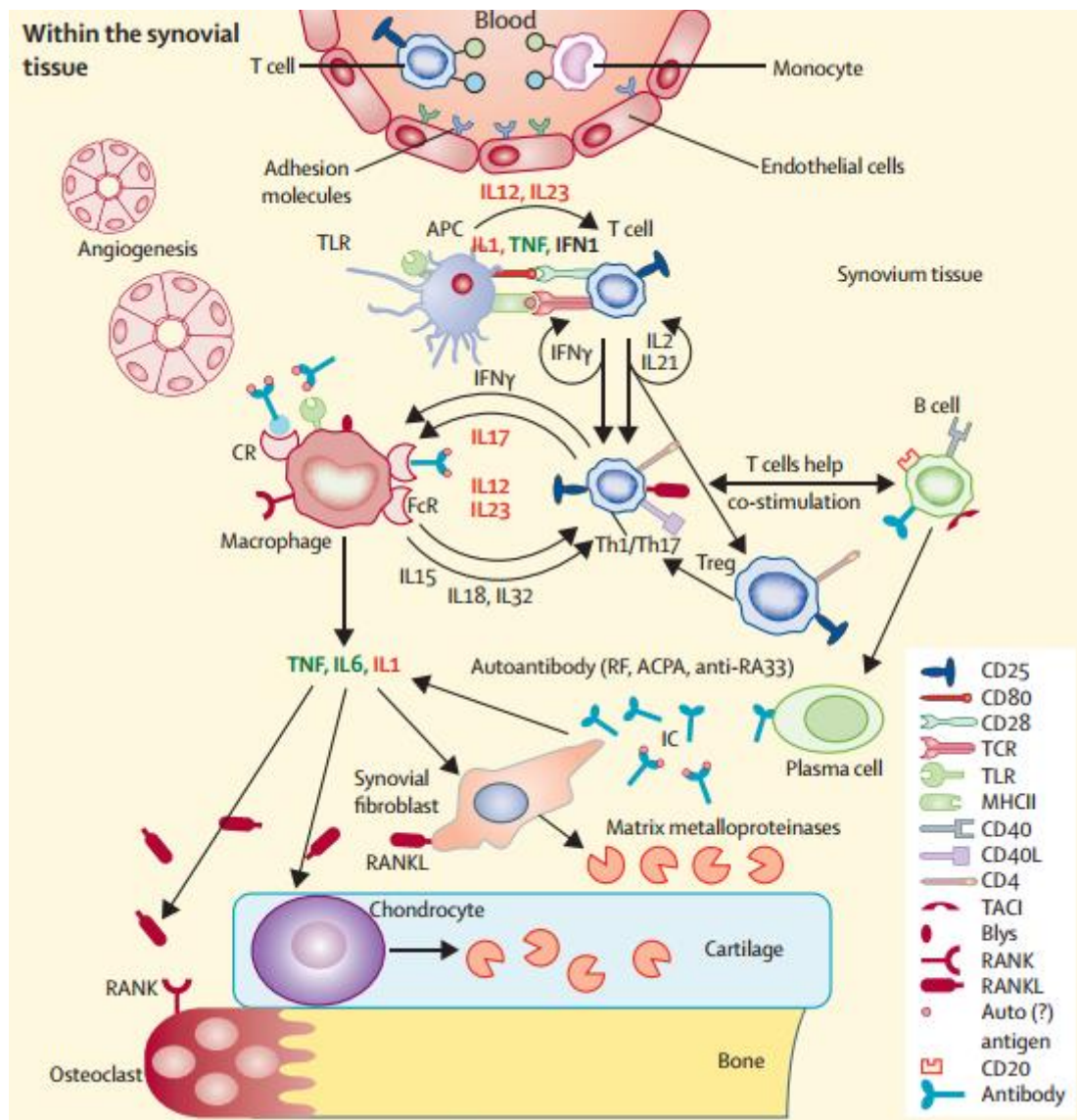
citrulinados aumentam, assim como as concentrações séricas de citocinas, especialmente antes do início do envolvimento articular (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

A fase de artrite se inicia com a infiltração de leucócitos na sinóvia devido à ativação endotelial, que aumenta a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. As APC apresentam o antígeno ao linfócito T pela interação do MHC com o receptor de célula T (TCR). A ativação do linfócito T somente ocorre após um sinal coestimulador mediado pela interação do CD28 no linfócito T com CD80/86 na APC. As funções da célula B são apresentação de antígeno (CATRINA et al., 2016) e produção de anticorpos. O macrófago ativado pela célula T ou por imunocomplexos produz muitas citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) -1 e IL-6, que aumentam a expressão de moléculas de adesão. A célula T ativada pode diferenciar-se em vários fenótipos, como T-helper 17 (Th17), que são dependentes da estimulação pela IL-6 e produzem IL-17. Esta última aumenta a liberação de citocinas que destroem a cartilagem e a expressão de moléculas relacionadas com a reabsorção óssea, como o ligante do receptor do ativador do fator nuclear *kappa* B (RANKL) (MCINNES; SCHETT, 2011) (figura 1) .

Condições de hipóxia e citocinas estimulam a neoangiogênese e a linfangiogênese insuficiente limita o egresso celular, permitindo o acúmulo de leucócitos. Ocorre profunda alteração estrutural na sinóvia e ativação local de fibroblastos, o que caracteriza o tecido inflamatório sinovial (pannus). Este tecido se infiltra na cartilagem articular; citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17 agem sinergicamente para liberar metaloproteases da matriz (MPP) por fibroblastos e macrófagos. As MPP são capazes de degradar todas as proteínas estruturais na matriz extracelular da cartilagem. Além da invasão de toda a articulação, o pannus também invade outros tecidos, como ligamentos, tendões e ossos.

O desenvolvimento de erosões ósseas ocorre precocemente na AR. A reabsorção óssea é mediada pelos osteoclastos, que são ativados pelo RANKL, que é uma proteína transmembranar produzida pelos osteoblastos. Esta se liga ao receptor ativador do fator nuclear *kappa* B (RANK), presente no precursor do osteoclasto, promovendo a maturação do osteoclasto. Os osteoclastos, as células principais de reabsorção óssea, são altamente responsivos aos autoanticorpos e citocinas inflamatórias, em particular TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6, que induzem a diferenciação de osteoclastos diretamente ou por induzir o RANKL (MCINNES; SCHETT, 2017). Este processo é antagonizado pela osteoprotegerina (OPG), uma proteína solúvel da superfamília do receptor de TNF, que funciona como um receptor de RANKL, sendo capaz de inibir a produção de osteoclastos. Na AR há um desequilíbrio entre RANKL e OPG que favorece a reabsorção óssea, formando as erosões (MCINNES; SCHETT, 2011).

Figura 1 - Patogênese da Artrite Reumatoide



A figura ilustra mecanismos fisiopatogênicos da artrite reumatoide dentro da membrana sinovial. *Adhesion molecules*: moléculas de adesão. *Angiogenesis*: angiogênese. *T cell help co-stimulation*: Células T auxiliam a coestimulação. *Autoantibody* (RF, ACPA, anti-RA33) : autoanticorpos ( fator reumatoide, anticorpo anti-peptídeo citrulinado, anti – RA33). *Blood*: sangue. *Bone*: osso. *Cartilage*: cartilagem. *Chondrocyte*: condrócito. *Endothelial cells*: células endoteliais. *Macrophage*: macrófago. *Matrix metalloproteinases*: metaloproteases da matriz. *Monocyte*: monócito. *Osteoclast*: osteoclasto. *Plasma cell*: plasmócito. *RANK*: Receptor ativador do fator nuclear kappa B. *RANKL*: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B. *Synovial fibroblast*: fibroblasto sinovial. *Synovium tissue*: tecido sinovial

**Fonte:** modificado de Smolen, 2016

### 1.1.3 Manifestações Clínicas e Laboratoriais

As articulações mais envolvidas são as metacarpofalangeanas (MCF), interfalangeanas proximais (IFP), metatarsofalangeanas (MTF), punhos, joelhos, cotovelos, tornozelos, quadris e ombros, em ordem decrescente de frequência. Quase sempre poupa as interfalangeanas distais (IFD). Pode afetar qualquer articulação sinovial. Classicamente o acometimento é simétrico e poliarticular, contudo esta apresentação é encontrada mais tardiamente, com a doença estabelecida (BURMESTER; POPE, 2017).

As manifestações extra-articulares podem ocorrer em até 40% dos pacientes em algum momento da doença, e está associado a pior prognóstico, especialmente a vasculite e a doença pulmonar reumatoide (TURESSON; O'FALLON; CROWSON, 2003). Além disso, o estado inflamatório crônico da artrite reumatóide tem sido associado a amiloidose secundária, linfoma, doença cardiovascular e aumento da mortalidade. Todos esses riscos parecem ter sido reduzidos com as estratégias terapêuticas modernas (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

O diagnóstico é feito com base no quadro clínico e laboratorial. Não há exame laboratorial patognomônico para o diagnóstico da AR. Os auto-anticorpos fator reumatoide (FR) e anti-peptídeo citrulinado (anti-CCP) são muito utilizados na prática clínica, assim como velocidade de hemossedimentação (VHS) e a proteína C reativa (PCR), que têm correlação com a atividade da doença.

Para a inclusão de um paciente em estudo científico, são utilizados os critérios classificatórios do *American College of Rheumatology (ACR) / European League Against Rheumatism (EULAR)* (ALETAHA et al., 2010), que compreendem 4 domínios: número e tipo das articulações afetadas, presença de FR e/ou anti-CCP, proteínas de fase aguda (VHS e PCR) e duração dos sintomas (tabela 1).

**Tabela 1 - Critérios de classificação do ACR/EULAR 2010 para artrite reumatoide**

<b>População-alvo (quem deve ser testado?)</b>	
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema). *	
Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença.	
*Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriásica e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.	
<b>Envolvimento articular</b>	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	2
4-10 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	3
10 articulações (pelo menos 1 pequena articulação)	5
<b>Sorologia</b>	
FR negativo e AACP negativos	0
FR positivo em título baixo ou AACP positivo em título baixo	2
FR positivo em título alto ou AACP positivo em título alto	3
<b>Provas de fase aguda (pelo menos 1 é requerida)</b>	
PCR normal e VHS normal	0
PCR anormal ou VHS anormal	1
<b>Duração dos sintomas</b>	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR. O domínio acometimento articular refere-se a qualquer articulação dolorosa ou inchada (excluindo interfalangeanas distais do pé ou da mão, primeira metatarsofalangeana e primeira carpometacarpeana). Evidência adicional obtida por exames de imagem pode ser utilizada para confirmação dos achados clínicos. Consideram-se, para fins de classificação, como pequenas articulações as metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, metatarsofalangeanas (segunda a quinta), primeira interfalangeana e punhos, e como grandes articulações ombros, cotovelos, quadril, joelhos, tornozelos. Articulações adicionais (temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, entre outras) podem ser contadas, na avaliação de “mais de 10 articulações”, desde que uma pequena articulação (ao menos) esteja acometida.

No domínio sorologia, considera-se o resultado de fator reumatoide ou de anticorpos anti-peptídeos/proteínas citrulinadas negativo se o valor encontrado for igual ou menor ao limite superior da normalidade para o respectivo laboratório; positivo baixo se o valor encontrado for maior que o limite superior da normalidade, mas menor ou igual a três vezes o limite superior da normalidade; e positivo alto quando o valor encontrado for superior a três vezes o limite superior da normalidade.

O domínio duração dos sintomas se refere ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da avaliação.

Já as provas de atividade inflamatória (velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa) são consideradas normais ou anormais de acordo com o valor de referência do laboratório utilizado.

ACPA: *anti-citrullinated protein antibodies*; ACR: *American College of Rheumatology*; EULAR: *European League Against Rheumatism*; FR: fator reumatoide; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação

**Fonte:** modificado de (ALETAKA et al., 2010)

#### 1.1.4 Avaliação da Atividade da Doença e Definição do Alvo de Tratamento

O índice *Disease Activity Score 28* (DAS 28) tornou-se um padrão para uso em prática clínica e ensaios clínicos, está validado e é empregado de forma confiável em ensaios clínicos e outras análises. Consiste na contagem articular de 28 articulações (IFP, MCF, punhos, cotovelos, ombros e joelhos, bilateralmente) e determinam um valor numérico para atividade da AR (tabela 2) (PREVOO et al., 1995). Esse valor numérico é calculado pela fórmula matemática:  $0,56 \times \sqrt{\text{NAD28}} + 0,28 \times \sqrt{\text{NAE28}} + 0,70 \times \text{Ln VHS} + 0,014 \times \text{AGS}$ , onde NAD28 é o número de articulações dolorosas dentre 28 pré determinadas, NAE28 é o número de articulações edemaciadas dentre 28 articulações pré determinadas, Ln é o logaritmo e AGS é avaliação global de saúde. Pode ser facilmente calculado com auxílio de calculadoras disponíveis na internet ([www.das-score.nl](http://www.das-score.nl)) ou aplicativos de celular.

As definições de doença em remissão, baixa atividade, moderada atividade e alta atividade referem-se aos valores obtidos com o índice *Disease Activity Score 28* (DAS 28) (tabela 2).

**Tabela 2** - Classificação da Atividade da Doença de Acordo com os Critérios Propostos pelo *Disease Activity Score 28* (DAS 28)

<b>Estado de atividade</b>	<b>DAS28</b>
Remissão	≤2,6
Baixa	≤3,2
Moderada	≤5,1
Alta	>5,1

**Fonte:** Prevoo, 1995

### 1.1.5 Tratamento

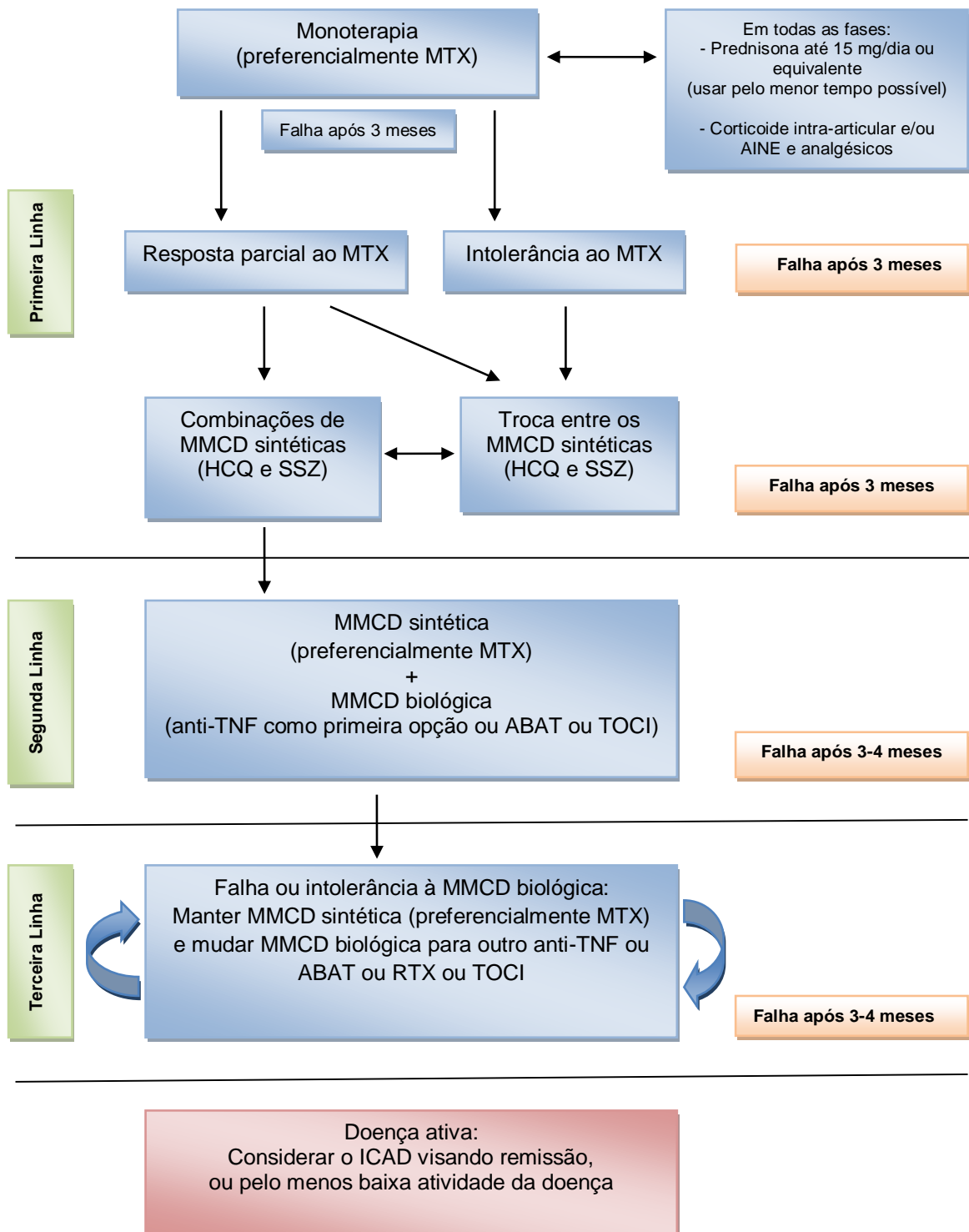
O tratamento da AR mudou consideravelmente na última década. Além dos novos medicamentos, estratégias de tratamento com alvos terapêuticos bem definidos e instrumentos para avaliação objetiva da atividade da doença foram adotados na prática clínica dos reumatologistas. Estas intervenções mudaram o prognóstico da doença, diminuindo as sequelas articulares, as manifestações sistêmicas e a incapacidade laboral (BURMESTER; POPE, 2017).

#### 1.1.5.1 Tratamento medicamentoso

Inicialmente e em todas as fases da doença, podem ser utilizados anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e glicocorticoides; estes últimos na menor dose possível e pelo menor tempo possível, até que as medicações modificadoras do curso da doença (MMCD) estejam fazendo efeito.

As MMCD podem ser classificadas em sintéticas convencionais [metotrexato (MTX), leflunomida, hidroxiclороquina, sulfassalazina], sintéticas alvo (tofacitinibe) e MMCD biológicas. As Diretrizes Brasileiras para Tratamento da Artrite Reumatoide (MOTA et al., 2013) estão de acordo com diretrizes internacionais, que recomendam MTX como fármaco de primeira escolha, em monoterapia (SINGH et al., 2016; SMOLEN et al., 2017) ou em associação a hidroxiclороquina, sulfassalazina e leflunomida. Agentes biológicos foram desenvolvidos especificamente para inibir determinadas citocinas ou grupos celulares. No Brasil, a indicação de um agente biológico está vinculada a falha de um ou mais MMCD, segundo as Diretrizes para o tratamento da AR (MOTA et al., 2013) (figura 2).

Figura 2 – Fluxograma para Tratamento Medicamentoso da Artrite Reumatoide



ABAT: abatacepte; AINE: anti-inflamatórios não esteroidais; MMCD: medicação modificadora do curso da doença; ICAD: índices compostos de atividade da doença; MTX: metotrexato; RTX rituximabe; TOCI: tocilizumabe; HCQ: hidroxicloroquina; SSZ: sulfassalazina.

Fonte: adaptado de Motta, 2013

### 1.1.5.2 Medicações modificadoras do curso da doença (MMCD) sintéticos convencionais

O MTX é a medicação de primeira escolha na AR, em monoterapia ou em associação. É um análogo estrutural do ácido fólico e age inibindo a enzima dihidrofolato redutase (DHFR) e outras enzimas folato-dependentes, como a 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase (AICAR T'ase). A inibição das enzimas folato-dependentes, principalmente da AICAR T'ase, interfere com a capacidade do ácido fólico para servir como cofator para uma variedade de enzimas essenciais para a síntese de purina e pirimidina na replicação celular, inibindo a proliferação de linfócitos, reduzindo a acumulação de leucócitos nos sítios inflamatórios e interferindo na síntese das interleucinas, principalmente IL-1 e IL-6, e do TNF- $\alpha$  (HOCHBERG et al., 2015). Outras hipóteses para explicar os efeitos imunossupressores do MTX foram sugeridas: estudo in vitro demonstrou que o MTX pode aumentar a sensibilidade de uma linha de células T cultivadas à apoptose através de um mecanismo dependente da *Jun N-terminal kinase* (JNK) (SPURLOCK III et al., 2011).

Os antimaláricos hidroxicloroquina e difosfato de cloroquina apresentam efeitos anti-inflamatórios como a inibição da síntese de IL-1, a proliferação de linfócitos e a apresentação e o processamento de antígenos (CARVALHO; LANNA; BÉRTOLO, 2013). Além disso, inibiriam a ação de determinadas enzimas proteolíticas pela alteração do pH no interior de organelas lisossomais e inibiriam receptores intracelulares tipo Toll (TLR), particularmente TLR9 (HOCHBERG et al., 2015).

A sulfassalazina tem importantes efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, inibindo a síntese de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , a proliferação de células B e a migração de leucócitos (CARVALHO; LANNA; BÉRTOLO, 2013). Estudos mostram efeitos de eliminação de SSZ e seus metabólitos em espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), de modo que a SSZ pode mediar seus efeitos anti-inflamatórios através da prevenção de danos oxidativos e nitrosativos (COUTO et al., 2010).

A leflunomida é um pró-fármaco, que se converte rapidamente após a primeira passagem no fígado em seu metabólito ativo A77 1726, a teriflunomida. A77 1726 inibe a dihidroorotato desidrogenase (DHODH), uma enzima mitocondrial que é crítica para a síntese *de novo* de pirimidinas; linfócitos são altamente dependentes desta via para a síntese de nucleotídeos, havendo assim o bloqueio da proliferação dessas células. As pirimidinas também são necessárias para que as células em proliferação formem os lipídios e as macromoléculas essenciais para várias funções celulares (FOX et al., 1999). Outros mecanismos de ação são: inibição da adesão de leucócitos a células endoteliais vasculares; efeito preferencial nos linfócitos autorreativos que compõem a população de células da

memória; interferência com a função das células dendríticas, levando a uma interrupção da apresentação do antígeno; e diminuição significativamente dos níveis de infiltração sinovial de linfócitos e sinoviócitos tipo I. A teriflunomida também inibe a secreção de IL-10 e IL-11 e reduz a síntese de IL-2; pode aumentar a síntese de TGF-beta, uma citocina que exerce um efeito de amortecimento no sistema imunológico em algumas configurações. Estudos in-vitro demonstraram que A77 1726 inibe dois importantes fatores transcricionais críticos para a função das células do sistema imunológico e inflamação: atividade da tirosina quinase e ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e expressão gênica. Parece também que A77 1726 pode bloquear diretamente a via JAK / STAT, inibindo a produção de IL-17 (HOCHBERG et al., 2015).

#### 1.1.5.3 MMCD Sintéticos Alvo: Tofacitinibe

É o primeiro MMCD sintético alvo aprovado, sendo um inibidor da tirosina quinase Janus (JAK) 1, 2 e 3; a inibição de JAK interfere com a transdução do sinal e, portanto, a ativação celular induzida pela IL-6, pelo fator estimulador da colônia de granulócitos-monócitos, e também pelos interferons (tipo I e tipo II) e citocinas comuns da cadeia  $\gamma$  (como IL-2 e IL-15) (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

#### 1.1.5.4 MMCD Biológicas

Podem ser utilizadas as seguintes MMCD biológicas na AR: inibidores do TNF- $\alpha$ , inibidor de IL-6 (tocilizumabe), inibidor da coestimulação (abatacepte) e depletor de linfócitos B (rituximabe).

Atualmente existem cinco diferentes fármacos que inibem o TNF- $\alpha$ . Este é produzido principalmente por monócitos e macrófagos, mas também pode ser produzido por outros tipos de células (por exemplo, células B, células T, mastócitos e fibroblastos). O TNF- $\alpha$  tem papel importante na patogênese da AR por induzir citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6; ativação de neutrófilos e eosinófilos; aumentar a migração de leucócitos devido ao aumento da permeabilidade da camada endotelial; estimula células endoteliais para expressar moléculas de adesão; indução da síntese de reagentes de fase aguda e indução de enzimas degradantes de tecido (enzimas metaloproteinase de matriz) produzidas por sinoviócitos e / ou condrócitos; inibe a síntese de proteoglicanos em cartilagem (HOCHBERG et al., 2015; WEINBLATT et al., 2003). Eles são semelhantes em eficácia e

segurança e nenhum estudo até o momento demonstrou evidência para recomendar sua prescrição em primeiro lugar (SMOLEN et al., 2017).

O infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico específico contra o TNF- $\alpha$  e sua estrutura proteica contém aproximadamente 25% de origem murina e 75% humana.

O etanercepte é uma proteína de fusão da porção extracelular do receptor tipo II do TNF (p75) e da porção Fc da imunoglobulina (Ig) G1 humana. A proteína resultante é capaz de se ligar com alta afinidade ao TNF- $\alpha$  circulante e também ao TNF- $\alpha$  ligado a seu receptor em células-alvo. Em contraste com os anticorpos monoclonais, o etanercepte não induz a lise celular nem a apoptose de células que expressam TNF- $\alpha$ . Sua meia-vida em pacientes adultos com AR é de 102 horas ( $\pm$  30 horas) (HOCHBERG et al., 2015).

O adalimumabe e golimumabe são anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra o TNF- $\alpha$  e o certolizumabe é um fragmento Fab de um anticorpo anti-TNF- $\alpha$  humanizado, com alta afinidade pelo TNF- $\alpha$ , conjugado com duas moléculas de polietilenoglicol (HOCHBERG et al., 2015).

Com diferente mecanismo de ação, o abatacepte é um anticorpo monoclonal que inibe a coestimulação do linfócito T (figura 1). É formado pela fusão entre a porção extracelular da molécula *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) e a porção Fc modificada da IgG1 humana, o abatacepte se liga a CD-80/86 com maior afinidade que o CD-28, modulando o mecanismo de coestimulação. A modulação da atividade das células T através do bloqueio de sinais coestimuladores controla a inflamação na AR (HOCHBERG et al., 2015).

O tocilizumabe reconhece o sítio de ligação de IL-6, fazendo bloqueio competitivo do seu receptor (figura 1). É um anticorpo monoclonal humanizado, geneticamente manipulado a partir de um anticorpo anti-humano IL-6R de camundongo. Pode se ligar tanto ao receptor solúvel quanto ao de membrana, inibindo tanto a sinalização clássica como a sinalização trans em células que expressam mL-6R ou gp130 (HOCHBERG et al., 2015).

O rituximabe é um anticorpo monoclonal anti-CD20. CD20 é uma proteína expressa na superfície de células B maduras que saíram da medula óssea para entrar na circulação. Não se expressa nem nas células-tronco nem nas células plasmáticas, o que torna uma opção terapêutica atrativa do ponto de vista de segurança, já que não diminui os níveis de imunoglobulinas, pelo menos na terapêutica inicial (figura 1) (HOCHBERG et al., 2015).

## 1.2 SÍNDROME METABÓLICA E AR

Síndrome Metabólica (SM) é definida como um conjunto de fatores de risco cardiovasculares que ocorrem ao mesmo tempo - obesidade central, dislipidemia, hipertensão e hiperglicemia – que é avaliado com o objetivo de predizer risco para doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes tipo 2 (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005; GRUNDY et al., 2002); ela predispõe a um estado pró-inflamatório, pró-trombótico, associado a níveis elevados de PCR, IL-6 e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) (RUTTER et al., 2004). A SM é responsável por um aumento de três vezes no risco de DCV e aumento da mortalidade por DCV em comparação com a população em geral (FORD, 2005) e está associada a um aumento de quatro vezes no risco relativo de desenvolver diabetes (HANLEY et al., 2005) .

Existem várias definições para SM, sendo a do *National Cholesterol Education Program* (NCEP) *Adult Treatment Panel III* (ATP III) a mais utilizada. Estes critérios requerem a presença de três dos seguintes componentes: obesidade abdominal, definida como circunferência da cintura em homens  $\geq 102$  cm e em mulheres  $\geq 88$  cm; triglicerídeos séricos  $\geq 150$  mg/dL ou tratamento medicamentoso para hipertrigliceridemia; lipoproteínas séricas de alta densidade (HDL)  $< 40$  mg/dL em homens e  $< 50$  mg/dL em mulheres ou tratamento medicamentoso para dislipidemia; pressão arterial  $\geq 130/85$  mmHg ou tratamento medicamentoso para hipertensão arterial; glicose plasmática em jejum  $\geq 100$  mg /dL ou tratamento com fármaco para diabetes (GRUNDY et al., 2002).

A SM é considerada uma comorbidade da AR (PEREIRA et al., 2012); essa primeira condição que têm como componentes mais importantes a resistência insulínica e o aumento da gordura abdominal, está também intimamente ligada à inflamação. Tal relação com a inflamação pode justificar a maior prevalência de SM em pacientes com AR, e a maior atividade da doença encontrada nos pacientes com AR que apresentam SM (PEREIRA et al., 2012). Os pacientes com AR têm expectativa de vida reduzida, sendo que um terço a metade das causas de mortalidade precoce são devido as DCV, incluindo doença isquêmica coronariana e acidente vascular encefálico (AVIÑA-ZUBIETA et al., 2008). Demonstrou-se que a ativação autoimune de leucócitos leva à produção de citocinas e mediadores de inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial, que conduzem de forma coordenada ao desenvolvimento da aterosclerose (SKEOCH; BRUCE, 2015).

Vários estudos mostram que a prevalência da SM está aumentada em pacientes com AR. Chung et al. (2008) realizaram um estudo de 88 pacientes com AR precoce, 66 com AR de longa data e 85 controles. A SM estava presente em 31 por cento dos pacientes com AR precoce, em 42 por cento daqueles com AR de longa data e em 11 por cento dos controles.

Além disso, aqueles com SM apresentaram maior probabilidade de ter calcificação coronariana, conforme detectado pela tomografia computadorizada (CHUNG et al., 2008). Um estudo realizado em população brasileira relatou uma associação independente de AR com SM (39,2% de pacientes com AR versus 19,5% no grupo controle) e com atividade da doença (DA CUNHA et al., 2012). Uma metanálise recente estudou separadamente a prevalência e a odds ratio de SM em pacientes com AR: encontrou uma prevalência de 30,65%, variando de 14,32% a 37,83%, e uma *odds ratio* de 1,44, variando de 0,70 a 4,09, dependendo dos critérios diagnósticos utilizados, concluindo que devido à alta prevalência de SM em pacientes com AR e alto risco de SM, a pesquisa de SM em pacientes com AR é fortemente recomendada (HALLAJZADEH et al., 2017).

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

#### 1.3.1 Conceito

O metabolismo celular produz diferentes espécies reativas como subprodutos. Dentre elas, as de maior relevância são as ERO e as ERN, as quais reagem rapidamente com outras moléculas ou radicais, causando oxidação seletiva de moléculas de lipídeos, proteínas ou DNA (KALYANARAMAN, 2013).

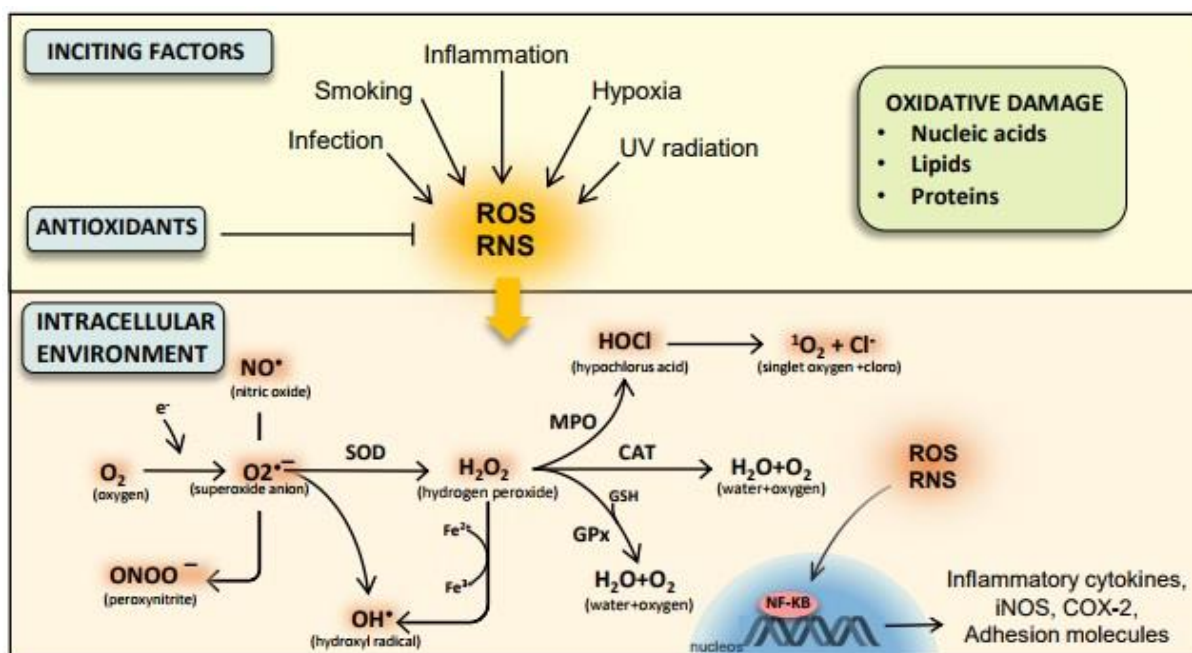
Denomina-se estresse oxidativo a condição resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes, em favor do primeiro, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou danos moleculares (JONES, 2006). A geração e a ação de substâncias oxidantes e antioxidantes dependem de um sistema de óxido-redução, onde oxidação implica em ganho de elétrons e redução em perda. Assim, tem-se utilizado o termo desequilíbrio no sistema redox para se referir ao estresse oxidativo (SANTOS, CELIO X; TANAKA LY, WOSNIAK J, 2009).

As principais ERO são o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ), perhidroxil ( $HO_2^{\cdot}$ ) e hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), e as espécies não reativas peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), que são facilmente transformadas em radicais livres. Óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), dióxido nítrico ( $NO_2^{\cdot}$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) representam as mais importantes ERN (QUIÑONEZ-FLORES et al., 2016). Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio ( $O_2$ ) consumido na mitocôndria por meio da cadeia transportadora de elétrons; assim, a mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e por reações químicas de oxidação direta (BARBOSA et al., 2010). Os mecanismos de geração de

radicais livres ocorrem também em macrófagos e neutrófilos, endotélio, epitélio, sistemas enzimáticos (mieloperoxidase, xantina oxidase, NADPH-oxidase, NADPH-citocromo P450 redutase, ciclo-oxigenase, óxido nítrico (NO) sintetase), reações com metal (ferro e cobre) e reação não enzimática entre os radicais superóxido e NO resultando na formação de peroxinitrito (figura 4).

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é o dano a lipídeos, proteínas e nucleotídeos, induzindo respostas celulares por meio da geração de espécies reativas secundárias que levarão à morte celular por necrose ou apoptose (BISWAS, 2016). Contudo, desempenha importante papel na sinalização celular, regula a ação hormonal, fatores de crescimento, citocinas, transcrição, apoptose, transporte de íons, imunomodulação e neuromodulação. As ERO e ERN são necessárias para a ativação de vários mecanismos de defesa celular (BISWAS, 2016).

Figura 3 - Geração de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio e Dano Celular



As ERO são produzidas durante o metabolismo normal das células aeróbicas; 85% a 90% do oxigênio ( $O_2$ ) consumido é metabolizado na mitocôndria por meio da cadeia transportadora de elétrons e os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e por reações químicas de oxidação direta. O superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) produzido a partir de várias fontes atua como uma espécie reativa primária.  $O_2^{\cdot-}$  reage rapidamente com o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) para produzir peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) ou é catalisado pela superóxido dismutase (SOD) para produzir peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  pode ser neutralizado por catalase ou glutatona peroxidase. No entanto, na presença de íons de metais de transição, como ferro ( $Fe^{2+}$ ) e cobre ( $Cu^+$ ), podem ser produzidos radicais livres de hidroxil altamente tóxicos ( $OH^{\cdot}$ ) a partir de  $H_2O_2$  (reação de Fenton). ERO podem agir como um segundo mensageiro para ativar o fator nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B), que orchestra a expressão de um espectro de genes envolvidos na resposta inflamatória e transcrição de citocinas pró-inflamatórias. CAT: catalase; COX-2: enzima ciclo-oxigenase;  $e^-$ : elétron desemparelhado;  $Fe^{2+}$ : íon ferroso; GPx: glutatona peroxidase; GSH: glutatona; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; MPO: mieloperoxidase; NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B; RNS: espécie reativa de nitrogênio; ROS: espécie reativa de oxigênio; SOD: superóxido dismutase. *Adhesion molecules*: moléculas de adesão. *Antioxidants*: antioxidantes. *Hydroxyl radical*: radical hidroxil. *Hypochlorous acid*: ácido hipocloroso. *Hypoxia*: hipóxia. *Inciting factors*: fatores desencadeantes. *Infection*: infecção. *Inflammation*: inflamação. *Inflammatory cytokines*: citocinas inflamatórias. *Intracellular environment*: ambiente intracelular. *Lipids*: lipídeos. *Nitric oxide*: óxido nítrico. *Nucleic acids*: ácidos nucleicos. *Oxidative damage*: dano oxidativo. *Oxygen*: oxigênio. *Peroxynitrite*: peroxinitrito. *Proteins*: proteínas. *Singlet oxygen*: oxigênio singleto. *Smoking*: tabagismo. *Superoxide anion*: ânion superóxido. *UV radiation*: radiação ultravioleta. *Water*: água.

Fonte: adaptado de Biswas, 2016

### 1.3.2 Marcadores do Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Um marcador deve ser razoavelmente estável, presente em um espécime facilmente acessível e sua medida deve ser factível. Devem ser levadas em consideração na

interpretação de dados as possíveis limitações e vieses de cada método. Sugeriu-se que a avaliação do estresse oxidativo usando mais de um critério poderia superar esses erros inerentes a cada método. Neste contexto, os índices de *status redox* foram propostos e uma análise crítica dos marcadores deve ser realizada a partir do objetivo e delineamento do estudo e deve dar um índice global de estado redox em determinadas condições (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017).

Os principais marcadores de peroxidação lipídica, de oxidação proteica e do dano ao DNA são apresentados na tabela 3.

O sistema de defesa antioxidante endógeno pode ser dividido em enzimático e não enzimático. O enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GRd) e a catalase (CAT). Os endógenos não enzimáticos incluem o ácido úrico, albumina, hemoglobina, transferrina e bilirrubina.

Os sistemas antioxidantes responsáveis pela neutralização do peróxido de hidrogênio são a enzima catalase (CAT) e o sistema enzimático composto pelo tripeptídeo glutatona (GSH), GPx e GRd. Esse sistema opera em ciclos, uma vez que a GSH reduz o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  em reação catalisada pela GPx. Nesse processo a GSH é oxidada e, em um segundo momento, é regenerada pela GRd utilizando equivalentes redutores da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH). Apesar de compartilhar o mesmo substrato ( $H_2O_2$ ), ambos os sistemas enzimáticos funcionam de forma diferenciada. Enquanto a GPx remove pequenas quantidades, a CAT age de forma mais significativa contra níveis elevados de  $H_2O_2$  (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

**Tabela 3 – Marcadores do Estresse Nitro-oxidativo**

Marcador	Métodos	Limitações e fatores confundidores
<b>Peroxidação lipídica</b>		
HNE	HPLC GC-MS imunoensaio	
MDA, alcenos, alcadienos	espectrofotometria / fluorimetria (TBARS) HPLC (UV ou fluorescência) imunoensaio	Açúcares, aminoácidos, bilirrubina, albumina, hemólise
F2-IsoPs	GC-MS imunoensaio	Hemólise, especificidade do anticorpo
<b>Oxidação do DNA</b>		
8oxodG, 5-clorocitosina, 5- clorouracil, εdA, εdC	ELISA HPLC-ECD HPLC/GC-MS	Especificidade do anticorpo
<b>Oxidação proteínas</b>		
ALEs, AGEs	HPLC Western blot após separação eletroforética Imunohistoquímica ELISA	Heterogeneidade estrutural destes produtos, especificidade do anticorpo
Proteínas carbonílicas	Espectrofotometria HPLC, ELISA	
3-NO-Tyr	HPLC/GC-MS, ELISA	Possível nitração de resíduos de tirosina na amostra pela presença de nitrito e ácido, condições durante a precipitação de proteínas e hidrólise, especificidade do anticorpo
AOPP	MS Ensaio colorimétricos	
oxLDL	imunodeteção (ELISA)	Especificidade do anticorpo
IMA	ABC teste imunodeteção (ELISA)	Sensível a alterações do ph, temperatura e tempo de estocagem da amostra, especificidade do anticorpo

εdA : 1,N(6)-eteno-2'-deoxiadenosina, εdC : 3,N(4)-eteno-2'-deoxicitidina, 3-NO-Tyr : 3-nitrotirosina, 8oxodG: 8-oxo-2'-desoxiguanosina; ABC teste: capacidade de ligação da albumina ao cobalto; AGEs: produtos finais avançados da glicação; ALEs: produtos finais avançados da lipoxigenação; AOPP: produtos avançados da oxidação proteica; F2-IsoPs: F2-isoprostanos; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa, GC: gas cromatografia; HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; HPLC: cromatografia líquida de alta performance; ECD: detecção eletroquímica; IMA: albumina modificada pela isquemia; MS: espectroscopia de massa; MDA: malondialdeído; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, oxLDL.: lipoproteína de baixa densidade oxidada.

**Fonte:** adaptado de (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017)

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E AR

Na AR ocorre um aumento da produção de ERO e ERN e muitos pesquisadores acreditam que haja diminuição nas defesas antioxidantes (DESAI et al., 2010; GRINGHUIS et al., 2000; OZKAN et al., 2007). Em revisão sistemática recente, contudo, Quinonéz-Flores et al (2016) não puderam concluir que a atividade enzimática dos sistemas antioxidantes esteja deficiente na AR. Os estudos que avaliaram SOD, CAT, GPx e GR tiveram resultados conflitantes e inconclusivos, sendo encontrados níveis aumentados, diminuídos ou inalterados em pacientes com AR em comparação a controles.

A produção mitocondrial de ERO no sangue total e em monócitos de pacientes com AR está cinco vezes aumentada em comparação a indivíduos saudáveis (MIESEL; MURPHY; KRÖGER, 1996), o que sugere que o estresse oxidativo tenha papel principal na patogênese desta doença.

O papel do estresse oxidativo tem sido demonstrado na patogênese da AR mediante aumento de peróxido de hidrogênio que inibe a síntese de proteoglicanos da cartilagem (SCHALKWIJK et al., 1986). As ERO e ERN podem ativar metaloproteases, danificando componentes da matriz extracelular (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004). Além disso, a insuficiência de enzimas antioxidantes pode proporcionar a degradação da cartilagem, como concluíram Wruck et al. (2011), em estudo experimental, onde compararam camundongos *knock-out* do gene nuclear Nrf2 – fator de transcrição que regula a expressão gênica de enzimas antioxidantes - com animais que apresentavam o gene funcional (*Nrf2-wild – type control*) e demonstraram que os primeiros apresentaram lesões mais graves na cartilagem e maior dano oxidativo.

ERO e ERN podem afetar diretamente o DNA, prejudicando mecanismos reparadores. O dano oxidativo pode ocorrer sob a forma de quebras de cadeia de DNA ou das bases de nucleotídeos (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004). Os produtos de oxidação do DNA estão elevados em leucócitos e soros de pacientes com AR, em particular a 8-oxo-2'-desoxiguanosina (HAJIZADEH et al., 2003), que é citotóxico e mutagênico. Por sua vez, o óxido nítrico (NO), especialmente em altas concentrações, provoca a desaminação de desoxinucleotídeos, ruptura de cadeia de DNA e modificação de DNA por N nitrosaminas metabolicamente ativadas. Todos estes produtos podem levar a mutações somáticas (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004).

Na AR, a rápida proliferação celular decorrente da resposta inflamatória causa um microambiente de hipóxia da sinóvia articular e pressão intra-articular elevada, o que aumenta a produção de ERO pela fosforilação oxidativa celular e induz ciclos repetitivos de hipóxia / reoxigenação, podendo induzir fatores de transcrição que respondem a oxigenação

[*Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) e NF- $\kappa$ B], e levando à expressão de um espectro de genes que são críticos à persistência da sinovite (COIMBRA et al., 2004; HITCHON; EL-GABALAWY, 2004; PUFE et al., 2004) (figura 5). Em um estudo feito em camundongos com artrite induzida, os pesquisadores demonstraram que a hipóxia precedeu a inflamação e que houve correlação entre o grau de hipóxia e a gravidade da sinovite (JEON et al., 2008).

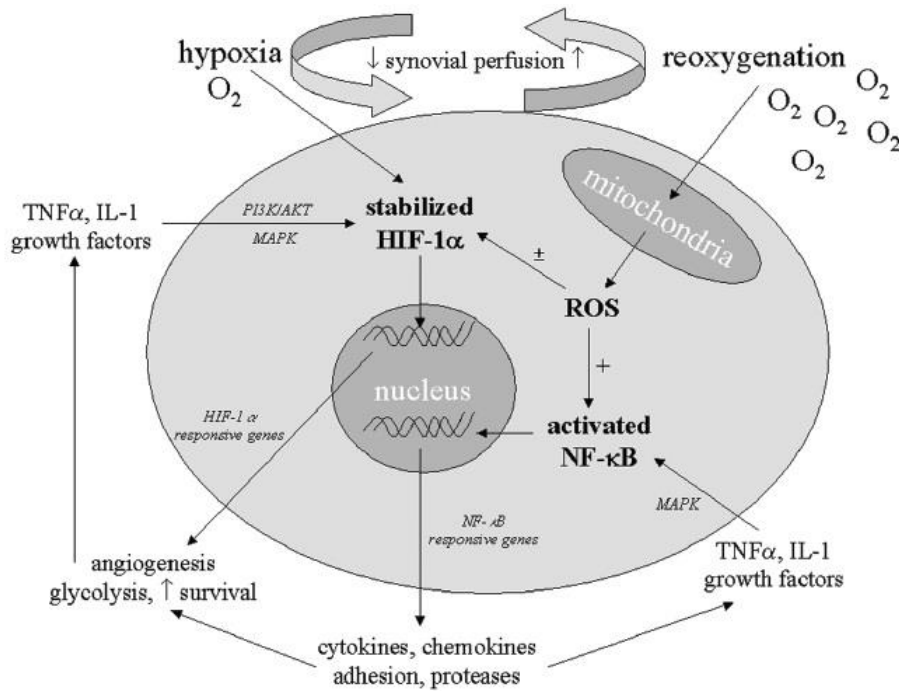
Os agentes anti-TNF- $\alpha$  parecem diminuir ou suprimir o estresse oxidativo nos pacientes com AR. Biniecka et al. (2011) dosaram 4HNE no líquido sinovial de 14 pacientes com AR e 4 pacientes com artrite psoriásica antes e 3 meses após uso de anti-TNF- $\alpha$  e concluíram que houve supressão do estresse oxidativo em todos eles. Etanercepte também diminuiu os marcadores do estresse oxidativo relacionados ao dano de proteínas, lipídios e DNA, havendo também correlação entre o EO e a atividade da doença medida pelo DAS28 (KAGEYAMA et al., 2008b). Cacciapaglia et al. (2016) avaliaram o efeito de agentes anti-TNF- $\alpha$  (etanercepte, adalimumabe ou golimumabe) sobre o estresse oxidativo de 40 pacientes com AR ativa, ao se iniciar a terapia anti-TNF- $\alpha$ , e após 24 e 52 semanas do início do estudo; utilizou-se o d-ROM *test* para avaliar níveis plasmáticos de hidroperóxidos sendo demonstrado que houve diminuição desses níveis, assim como correlação destes com a atividade da AR.

O tocilizumabe, inibidor de IL-6, parece ser mais efetivo em diminuir o estresse oxidativo do que os anti-TNF- $\alpha$ . Hirao et al. (2012) realizaram um estudo transversal, comparando 125 pacientes com AR, sendo 91 pacientes tratados com MMCD, 8 pacientes com anti-TNF- $\alpha$  (infliximabe ou etanercepte) e 26 pacientes tratados tocilizumabe; um quarto do grupo foi composto por 15 pacientes portadores de osteoartrite que foi utilizado como grupo controle. Todos os pacientes que utilizavam agentes biológicos, o fizeram por, pelo menos, três meses. O grupo anti IL-6 mostrou os menores níveis de ERO, medidos pelo d-ROM *test* com relação aos valores basais, dramaticamente menor que MMCD e com diferença estatística em relação ao grupo anti-TNF- $\alpha$ .

A peroxidação lipídica provavelmente contribui para o processo de aterosclerose acelerada na AR. A inflamação local e sistêmica persistente promove a lipólise, e a liberação sistêmica de ácidos graxos contribui para a dislipidemia vista na AR. O estresse oxidativo produzido pela inflamação local leva a oxidação do LDL local, que promove aumento de moléculas de adesão e citocinas (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004).

O estresse oxidativo correlacionou-se com a atividade da doença avaliada pelo DAS28 na maioria dos estudos (ALTINDAG et al., 2007; KAGEYAMA et al., 2008a; NAKAJIMA et al., 2014; SHAHMOHAMADNEJAD et al., 2015).

Figura 4 - Regulação das Vias do HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor*) e fator nuclear- $\kappa$ B por ERO e Estimulação por Citocinas



A complexa ativação destes dois fatores de transcrição críticos é fundamental para a maioria dos processos que sustentam a sinovite na AR, como ativação endotelial, recrutamento de leucócitos, angiogênese e aumento da sobrevivência da célula. IL: interleucina. HIF1 $\alpha$ : fator 1 $\alpha$  induzível por hipóxia. MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos. PI3K: fosfoinositídeo 3-quinase. TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa. *Activated*: ativado. *adhesion*: adesão. *Angiogenesis*: angiogênese. *Chemokines*: quimiocinas. *Cytokines*: citocinas. *Glycolysis*: glicólise. *Growth factors*: fatores de crescimento. *Hypoxia*: hipóxia. *Mitochondria*: mitocôndria. *Nucleus*: núcleo. *Proteases*: proteases. *Reoxygenation*: reoxigenação. *Responsive genes*: genes responsivos. *Stabilized*: estabilizado. *Survival*: sobrevivência. *Synovial perfusion*: perfusão sinovial.

**Fonte:** Adaptado de Hitchon, 2004

### 1.5 ÁCIDO ÚRICO E SUA RELAÇÃO COM ESTRESSE OXIDATIVO, SM E AR

O ácido úrico (AU) é o produto final do metabolismo de purinas endógenas e exógenas, sendo o fígado o principal local de sua síntese. A sua produção depende do equilíbrio entre a ingestão de purinas da dieta, da síntese *de novo* nas células, da reciclagem e da degradação das purinas pela enzima xantina oxidase na extremidade distal desta via (RICHETTE; BARDIN, 2010).

Há muitas evidências de que o AU desempenha importante função na ativação de mecanismos inflamatórios e outros mecanismos patogênicos, que contribuem para o desenvolvimento ou progressão da SM, diabetes tipo 2, hipertensão arterial e doença renal. Esses mecanismos incluem ativação da via renina-angiotensina, restrição da disponibilidade de NO, promoção do estresse oxidativo e disfunção do metabolismo intra-hepático da frutose (BECKER, 2017).

O AU tem um duplo papel no estado redox (SIMÃO; LOZOVYOY; DICHI, 2012). É o antioxidante mais abundante no plasma humano, sendo responsável por 60% da capacidade total de antioxidantes. Em um estudo anterior, realizado por este grupo de pesquisa, verificou-se que os pacientes com SM apresentaram aumento do estresse oxidativo, enquanto que o parâmetro antioxidante TRAP, um método usado para verificar a capacidade total de antioxidantes, não diminuiu, provavelmente devido ao aumento de AU (SIMÃO et al., 2008). Em ambiente hidrofílico, o AU possui propriedades de eliminação de radicais livres, pode remover o oxigênio singlete e estimula a expressão da SOD extracelular. No entanto, em condições de estresse oxidativo, o AU também pode atuar como um pró-oxidante através da ativação do sistema NADP oxidase, formando radicais em reações com outros oxidantes. Esses radicais parecem atingir predominantemente lipídios, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e membranas celulares. Ao mesmo tempo, o ambiente hidrofóbico criado é desfavorável para a ação antioxidante do AU e os lipídios oxidados podem até converter o AU em um oxidante (SIMÃO; LOZOVYOY; DICHI, 2012). O AU é um substrato para a MPO, uma enzima oxidativa expressa em neutrófilos e monócitos ativados, que na presença de peróxido de hidrogênio catalisa a formação das espécies reativas de  $O_2$  (5-hidroxiurato, hidroperóxido e radical urato) que, por sua vez, aceleram a oxidação da glutatona reduzida. O resultado é a geração de um estado pró-inflamatório que prejudica a função das moléculas anti-inflamatórias (por exemplo, lipoproteínas de alta densidade, HDL) e, potencialmente, das células endoteliais. Além disso, a formação de AU gera superóxido, que pode se combinar com o NO para formar o radical oxidante em longo prazo (BECKER, 2017).

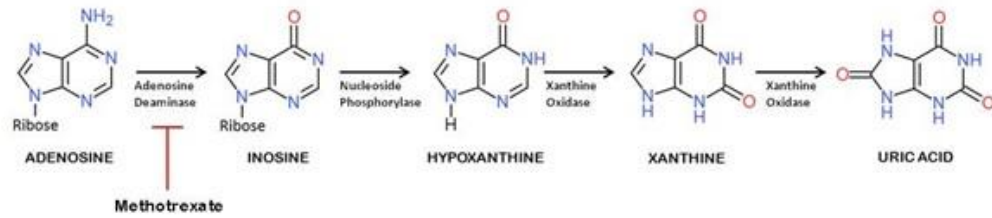
Em indivíduos com SM, a hiperuricemia frequentemente ocorre porque a insulina estimula a reabsorção de sódio e urato no túbulo proximal (JOHNSON et al., 2003). Demonstrou-se que a hiperuricemia é um preditor independente de DCV e mortalidade por todas as causas e pode prever o desenvolvimento de SM. Vários componentes da SM, como a circunferência abdominal, glicemia de jejum, insulina em jejum, resistência à insulina medida pela avaliação do modelo de homeostase - resistência à insulina (HOMA-IR) e hipertensão tem demonstrado associação significativa e direta com hiperuricemia, enquanto que o colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL- colesterol) mostrou associação significativa e inversa com a concentração sérica de AU (SIMÃO; LOZOVYOY; DICHI, 2012).

O AU pode causar hipertensão arterial pelo estímulo à proliferação de células de músculo liso vascular (FEIG; KANG; JOHNSON, 2008).

Estudos anteriores demonstraram o envolvimento do AU na fisiopatologia das DCV na AR: a associação de hiperuricemia e aumento do risco de DCV na AR parece ser mais forte do que o observado na população em geral, provavelmente devido à hipertensão arterial; outros fatores associados são a disfunção endotelial e a resistência à insulina (DAOUSSIS; KITAS, 2011); além disso, existem evidências de que o AU desempenha um papel crucial nas respostas inflamatórias: o AU induz a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) das células de músculo liso vascular através da ativação do NF- $\kappa$ B e da proteína quinase ativada por mitógenos p38 (MAPK) (KANELLIS et al., 2003); estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e o TNF- $\alpha$  (JOHNSON et al., 2003). Em um estudo populacional, as concentrações séricas de AU associaram-se fortemente a IL-6, PCR e TNF- $\alpha$  (LYNGDOH et al., 2011; RUGGIERO et al., 2009). Contudo, Choe et al. (2015) não encontraram correlação entre a queda do AU sérico e diminuição nos níveis de PCR e VHS.

Os medicamentos comumente utilizados no tratamento da AR, como a leflunomida e o MTX, podem diminuir os níveis de AU (CHOE; KIM, 2015; LEE et al., 2016). Supõe-se que a leflunomida aumente a excreção renal de AU, talvez agindo no túbulo proximal, já que houve concomitante diminuição nos níveis de fosfato (PEREZ-RUIZ; NOLLA, 2003). O MTX exerce grande parte dos seus efeitos anti-inflamatórios na AR aumentando os níveis locais de adenosina nos tecidos inflamados através da inibição da AICAR T'ase. Mais especificamente, a inibição destas enzimas envolvidas no metabolismo de folato e na síntese de purina leva a inibição da adenosina desaminase (ADA), aumentando assim os níveis de adenosina. O aumento da adenosina se associa a uma diminuição da xantina e AU (LEE et al., 2016) (figura 6).

Figura 5 - Via de Síntese das Purinas



Supõe-se que o metotrexato iniba indiretamente a ADA e aumente os níveis de adenosina. A ADA está envolvida na síntese de purina, incluindo o AU. ADA: adenosina-desaminase. AU: ácido úrico. Adenosine: adenosina. Inosine: inosina. Hypoxanthine: hipoxantina. Xanthine: xantina. Uric Acid: ácido úrico. Xantine oxidase: xantina-oxidase. Nucleoside phosphorilase: nucleosídeo fosforilase. Adenosine deaminase: adenosina deaminase.

Fonte : Lee et al., 2016

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando que :

- ERO e ERN têm importante papel na fisiopatologia da AR e na atividade da AR
- poucos trabalhos na literatura avaliaram a influência da SM e das MMCD no estresse nitro-oxidativo em pacientes com AR,
- novos preditores de diagnóstico, prognóstico e de resposta terapêutica serão úteis no monitoramento da AR.

Os resultados obtidos neste estudo poderão nos auxiliar no melhor entendimento da fisiopatologia da AR e identificar novos alvos terapêuticos.

### 3 OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da SM e MMCD em marcadores do estresse nitro-oxidativo em pacientes com AR.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do uso das MMCD no estresse nitro-oxidativo em pacientes com AR.
- Avaliar o estado redox em pacientes com AR na presença ou não de SM.
- Verificar se existem diferenças entre os sexos masculino e feminino no estado redox.
- Verificar se a SM na AR está associada aos marcadores do estresse oxidativo.
- Propor um modelo de preditores para a AR.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo observacional transversal envolvendo pacientes com AR acompanhados no ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) de Londrina.

### 4.2 POPULAÇÃO

Foram selecionados consecutivamente 177 pacientes com diagnóstico de AR, atendidos no ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) de Londrina entre março de 2013 e junho de 2014.

O grupo controle foi composto por 150 indivíduos saudáveis doadores de sangue, atendidos pelo Hemocentro Regional de Londrina.

Parâmetros como sexo, idade e etnia foram controlados em ambos os grupos. Nenhum dos participantes era etilista.

Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido antes da realização de qualquer procedimento (anexo A). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob parecer nº205.175 (apêndice A).

#### 4.2.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos os pacientes portadores de AR que preencheram os critérios de classificação do ACR/EULAR de 2010 e indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos.

#### 4.2.2 Critérios de Exclusão

No grupo controle, os critérios de exclusão foram a presença de doença autoimune, cardíaca, renal ou hepática, uso de medicamentos anti-inflamatórios ou de suplemento nutricional com atividade antioxidante. No grupo de pacientes foram excluídos aqueles com outras comorbidades associadas, como por exemplo, diabetes, doenças infecciosas

crônicas ou agudas, doenças autoimunes, doença hepática ou renal, uso de metformina e estatinas.

Informações referentes ao estilo de vida, duração da AR, tabagismo, manifestações extra-articulares, uso de anti-inflamatórios não esteroidais, corticosteroides, MMCD biológicas e sintéticas e antihipertensivos foram obtidas durante a consulta clínica destes pacientes.

#### 4.3 DETERMINAÇÕES ANTROPOMÉTRICAS

O peso corporal foi aferido utilizando balança eletrônica com escala de 0,1kg. Os indivíduos vestiam roupas leves, sem sapatos, pela manhã. A altura foi aferida por meio de estadiômetro com escala de 0,1 cm. A circunferência abdominal foi medida em centímetros, no meio da distância entre a crista ilíaca e o rebordo costal inferior, com o indivíduo em posição ortostática. Índice de massa corpórea (IMC) foi calculado segundo a fórmula: peso (kg) dividido pela altura (m) elevada ao quadrado. Foram realizadas três medidas de pressão arterial, com um intervalo de 1 minuto, usando um esfigmomanômetro calibrado no braço esquerdo, com o indivíduo na posição sentada. A média dessas medições foi utilizada na análise.

#### 4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS

As amostras de sangue foram coletadas após 12 horas de jejum. O sangue venoso foi retirado em tubos estéreis com ácido etileno diamino-tetra-acético (EDTA) e tubos estéreis BD Vacutainer® UltraTouch™. O sangue total foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 min. As amostras de plasma e soro foram separadas e divididas em alíquotas e depois armazenadas a -80 ° C para análise subsequente.

Lipoproteína de alta densidade (HDL), triacilglicerol (TG), glicose e ácido úrico (AU) foram avaliados por um auto-analisador bioquímico (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, EUA) usando kits Dade Behring®.

Os níveis séricos de proteína C reativa (PCR) foram medidos usando um ensaio turbidimétrico (C8000, ABBOTT, Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA).

## 4.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.5.1 Capacidade Antioxidante Total Plasmática

A capacidade antioxidante total plasmática foi avaliada por quimioluminescência (QL), utilizando a metodologia *total radical-trapping antioxidant parameter* (TRAP), em uma adaptação da técnica descrita por Repetto et al (REPETTO et al., 1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma. Ao meio de reação (1,8 mL de tampão glicina 0,1 M, pH 8,6) são acrescentados 100 µL de luminol em solução aquosa 200 µM, 5 µL de soro diluído 50% em tampão glicina e 100 µL de solução aquosa de 2,2' azo-bis (2-amidinopropano) 200 Mm. Sabe-se que o 2,2' azo-bis gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular, causando a oxidação de lipídeos e proteínas em biomoléculas (YOKOZAWA et al., 2000). Estes radicais livres reagem com o luminol (que atua como um amplificador de sinal), produzindo QL. Esta reação é inibida pela superóxido dismutase (SOD), catalase e análogos da vitamina E. A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (tempo de indução  $t_i$ ) proporcional à concentração plasmática de antioxidantes (TRAP) até que os radicais do luminol sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema foi calibrado com análogo de vitamina E (Trolox), 100µL na concentração de 20 µM em tampão glicina pH 8,6. Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma, permitirão obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox segundo a equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = D \times \frac{t_{\text{amostra}}}{t_{\text{Trolox}}}$$

D é um fator de diluição da amostra no meio de reação,  $t_{\text{amostra}}$  é o tempo de indução promovido pela adição da amostra de plasma,  $t_{\text{Trolox}}$  é o tempo de indução promovido por 1 µM de Trolox. Os resultados serão expressos em µM de Trolox. Este experimento será conduzido em um contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, utilizando-se um modo de contagem não coincidente por 30 minutos, com uma faixa de resposta entre 300 a 620 nM.

#### 4.5.2 Determinações de Produtos Avançados da Oxidação Proteica (AOPP)

Os níveis plasmáticos de AOPP foram determinados de acordo com o método de Witko-Sarsat et al (WITKO-SARSAT et al., 1998). Os valores foram expressos em  $\mu\text{moles/L}$  de equivalente de cloramina. A técnica é baseada na formação de produtos de oxidação de proteínas por ação de agentes oxidantes e posterior reação destes produtos de oxidação com o iodeto de potássio em meio ácido. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro termostaticado de duplo feixe (Thermo Spectronic® modelo Hélios- $\alpha$ , Waltham, MA, EUA).

#### 4.5.3 Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos Iniciados por Terc-butil (CL-LOOH)

A avaliação da formação de lipoperóxidos por QL foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Gonzalez-Flecha, Llesuy e Boveris (1991).(GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). A metodologia de CL-LOOH foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos presentes no plasma. Este teste baseia-se na premissa de que um aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E, com formação de lipoperóxidos, resultando em aumento da emissão de fótons. O método de QL foi realizado em equipamento luminômetro (GloMAX 20/20 Single Tube Luminometer, Promega Corporation, WI, USA). Uma média de leituras realizadas após uma hora de reação foi expressa em unidades relativas de luz (URL).

#### 4.5.4 Proteínas carbonílicas

O teor de proteínas carbonílicas foi medido como descrito por Reznick e Parker (REZNICK; PACKER, 1994). O teor de carbonil foi calculado pela leitura do pico de absorvância de amostras tratadas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e comparado com amostras tratadas apenas com ácido clorídrico. O conteúdo de carbonil foi expresso em nanogramas por mililitro de proteína total.

#### 4.5.5 Metabólitos do NO (NO<sub>x</sub>)

A concentração de NO na amostra foi estimada pela medição de NO<sub>x</sub> - nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) - utilizando-se esferas de cádmio para redução de nitrato em nitrito. As concentrações destes metabólitos foram posteriormente determinadas de acordo com o método proposto por Navarro-González (NAVARRO-GONZÁLEZ; GARCÍA-BENAYAS; ARENAS, 1998). Os valores de NO foram expressos em μM.

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi estimado estatisticamente usando GPower indicando que usando uma potência de 0,80, a nível  $<0,05$ , e com um efeito de 0,15 (com base na média e desvio padrão de alguns dos parâmetros previamente avaliados em outros estudos), a amostra do estudo para análise de covariância (2 grupos) deve ser em torno de 321. Portanto, 177 pacientes e 150 controles foram incluídos. As análises de variância (ANOVAs) ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney foram empregados para verificar diferenças entre os grupos para variáveis contínuas. As análises de tabelas de contingência ( $X^2$ -test) foram utilizadas para verificar as associações entre variáveis categóricas. As análises de modelos lineares generalizados multivariados (GLM) foram utilizadas para avaliar os efeitos multivariados das variáveis explanatórias (incluindo diagnóstico) em variáveis dependentes (incluindo biomarcadores do estresse nitrosativo e oxidativo), enquanto sexo, idade, IMC e SM foram controlados. Foram utilizados testes de efeitos entre os sujeitos para avaliar os efeitos univariáveis das variáveis preditoras significativas nas variáveis dependentes. As médias marginais estimadas [ $\pm$  erro padrão (SE)] foram calculados para interpretar as diferenças entre grupos entre variáveis independentes categóricas e as estimativas de parâmetros foram utilizadas para interpretar a direção e o impacto de variáveis independentes contínuas. Foram utilizadas análises de regressão logística binária automática para delinear as variáveis explanatórias mais significativas que predizem a AR (controles como grupo de referência) utilizando as seguintes variáveis explanatórias: biomarcadores do estresse oxidativo e nitrosativo, idade, SM, IMC com ou sem biomarcadores imunes. Alguns biomarcadores do estresse oxidativo e nitrosativo foram transformados em Ln (LOOH, AOPP, NOx) para normalizar sua distribuição (avaliada usando o teste de Kolmogorow-Smirnov). Utilizamos também as pontuações z transformadas para os biomarcadores para mostrar as diferenças entre os grupos e para calcular as pontuações compostas ponderadas da unidade z, incluindo um índice de estresse oxidativo como valor z de AOPP ( $z_{AOPP}$ ) + zLOOH ( $z_{AOPP} + z_{LOOH}$ );  $z_{NOx} - z_{TRAP}$  indicando o metabolismo do NO versus defesas antioxidantes ( $z_{NOx}/TRAP$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o IBM SPSS windows versão 22. Todos os resultados de regressão foram verificados para multicolinearidade usando VIP e tolerância. Os testes foram bicaudais e um nível alfa de 0,05 indicou resultados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos.

Artigo 1: Influence of Disease-Modifying Antirheumatic Drugs on Oxidative and Nitrosative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis, sob revisão na Revista *Rheumatology International* com fator de impacto 1.824.

Artigo 2: Metabolic Syndrome and the Decreased Levels of Uric Acid by Leflunomide Favor Redox Imbalance in Patients with Rheumatoid Arthritis encaminhado para Revista *Clinical and Experimental Medicine* com fator de impacto 2.919.

## **Influence of Disease-Modifying Antirheumatic Drugs on Oxidative and Nitrosative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis**

Neide Tomimura Costa<sup>1</sup>, Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda<sup>2</sup>, Daniela Frizon Alfieri<sup>3</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>3,4</sup>, Isaias Dichi<sup>5\*</sup>

1. Department of Rheumatology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
2. Department of Rheumatology – Pontifícia Universidade Católica (PUC), Londrina, Paraná, Brazil.
3. Research Laboratory of Applied Immunology - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
4. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
5. Department of Internal Medicine – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

\*Corresponding author: Isaias Dichi, MD, PhD. Department of Internal Medicine. Robert Koch Avenue n° 60 Bairro Cervejaria, University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440  
Tel: (55) 43 3371 2234 E-mail: [dichi@sercomtel.com.br](mailto:dichi@sercomtel.com.br)

## ABSTRACT

**Background:** Nitro-oxidative stress plays a central role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) and several articles show correlation with disease activity, however, aspects of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) on nitro-oxidative stress are poorly understood. **Objective:** to present the available data on the effect of the DMARDs on the nitro-oxidative stress in RA patients. **Methods:** A bibliographic search was carried out in the main electronic databases and the research was limited to human studies, independently of the publication date. **Results:** Most studies were performed with infliximab (IFX, 4 articles), tocilizumbe (TCZ, 3 articles) and metrotexate (MTX, 2 articles). MTX and leflunomide showed similar results with reduction of nitric oxide. The studies with TCZ verified a marked decrease of reactive oxygen and nitrogen species. Most studies with IFX found a reduction of protein oxidation, evaluated by protein carbonyl measurement. In the present review, the most remarkable results were observed with the increase of the antioxidant defenses through several markers and antioxidant systems. The only study with etanercept showed very similar results to those obtained with MTX, with decreased pentosidine and oxidative DNA damage. **Conclusions:** the majority of the studies reported in this work showed an improvement in the redox state, either by the decrease in oxidation markers or by the increase in antioxidant capacity, or both. This improvement in the redox state could be related to success of the therapy. Thus, oxidative and nitrosative stress markers may be useful to early evaluate the response of DMARDs in patients with RA.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, oxidative stress, nitrosative stress, disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs).

## 1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most prevalent autoimmune inflammatory arthropathy. It is a systemic disease that extends beyond the joints and can affect several organs, mainly lungs and eyes. The chronic inflammation in RA is associated with increased cardiovascular risk and mortality<sup>1</sup>. Oxidative stress plays a role in its pathogenesis. Reactive oxygen species (ROS) are important in intracellular molecular signaling, increase cell proliferative response in the synovial membrane and may damage components of the cartilaginous matrix<sup>2</sup>. Oxidative stress and inflammation act in integrated form to cause a progressive damage. When oxidative stress is the primary disturb, nuclear factor (NF- $\kappa$ B) pathways are activated with consequent cytokines and chemokines transcription; the inflammation develops as a consequence and oxidative stress is increased in a vicious circle. On the other hand, when inflammation is the primary disturb, it will lead to oxidative stress, which propitiates inflammation aggravation<sup>3</sup>. Most articles focus on pathogenesis and correlation with disease activity while only a small number has studied effects of drug treatment on oxidative stress. This article reviews the available data on the effect of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) used in the treatment of RA on oxidative stress.

## 2. Oxidative Stress in RA

Oxidative stress is characterized by an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of oxidants, leading to a dysregulation of redox signaling and alteration of physiological function<sup>4</sup>. Nitro-oxidative stress measurements in venous blood, synovial fluid and urinary samples are often used in studies with RA. The most commonly used markers are presented in table 1, whereas the generation of ROS, reactive nitrogen species (RNS) and antioxidant systems are shown in figure 1.

### 2.1 Evidence of lipid peroxidation in RA

Lipid peroxidation is a chain reaction in which the initial oxidation of some lipid molecules perpetuates significant tissue damage<sup>5</sup>. Oxidative modifications of phospholipids and proteins in the synovial membrane may increase their permeability, allowing the release of some pro-inflammatory and pro-oxidant mediators in blood<sup>6</sup>. Luczaj et al.<sup>6</sup> reported that a decrease in glutathione peroxidase (GPx) activity was correlated with increased lipid peroxidation products 4-hydroxynonenal (4-HNE), malondialdehyde (MDA), 4-oxononenal (4-ONE) and crotonaldehyde. The levels of 8 isoprostane prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (8-isoPGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) were nine times higher in plasma and three times higher in the urine of RA patients and were related to disease severity<sup>6</sup>.

The proliferation of synovial fibroblasts in response to inflammatory cytokines plays a key role in the pathogenesis of RA<sup>7</sup>. Yin et al.<sup>7</sup> carried out a study in which they identified inflammation-induced alterations by treatment with 4-HNE in MH7A cells, a human RA synovial cell line. They demonstrated after treatment with 4-HNE that pathways related to inflammation, such as nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and signal transducer and activator of transcription (STAT); lipid peroxidation induced the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) and apoptosis of synoviocytes were upregulated<sup>7</sup>.

Malondialdehyde is another important marker of lipid peroxidation. It was increased in serum<sup>8</sup> and in whole blood<sup>9</sup> of RA patients compared to healthy controls; Datta et al.<sup>5</sup> evaluated MDA in synovial fluid and found a positive correlation with DAS28. Other researchers did not find an increase in plasma MDA levels<sup>10</sup>.

Veselenovic et al.<sup>11</sup> found significantly elevated levels of MDA in RA patients compared to healthy control subjects. MDA separates spontaneously and form acetaldehyde (AA)<sup>12</sup>. Both MDA and AA are highly reactive aldehydes, and together have been shown to modify proteins to produce an MDA-AA protein adduct, termed malondialdehyde-acetaldehyde (MAA); Thiele et al.<sup>13</sup> examined synovial tissues from patients with RA and osteoarthritis and demonstrated that the formation of MAA adduct is increased in RA and appears to result in antibody responses that are strongly associated with anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP). F2-isoprostanes (F2-Iso) were also increased in RA patients compared to healthy controls measured in urine<sup>14</sup> and plasma<sup>15</sup>. On the other hand, Costa et al.<sup>16</sup> did not find differences on lipid hydroperoxide levels between RA patients and healthy controls.

## **2.2 Evidence of protein oxidation in RA**

Protein oxidation evaluated by the advanced oxidation protein products (AOPP) presents controversial results in the literature. Serum AOPP was found at higher levels in RA patients compared to healthy control group<sup>17</sup>; Datta et al.<sup>5</sup> measured AOPP in the synovial fluid of RA patients and found a positive correlation with DAS28. Costa et al.<sup>16</sup> divided patients with RA into two groups according to the presence or absence of insulin resistance (IR); the RA group with IR presented higher AOPP levels than the RA group without IR<sup>16</sup>. Moreover, the AOPP elevation was associated with the presence of IR, which corroborate with another study from our group demonstrating that AOPP is the most appropriate parameter for the determination of oxidative stress in patients with metabolic syndrome<sup>18</sup>.

Several authors showed that patients with RA had increased protein carbonyl (PC)<sup>19-21</sup> and decreased levels of sulfhydryl groups<sup>19</sup> compared to control groups of healthy individuals. Sulfhydryl groups are responsible for maintaining the structure and function of proteins, enzymes and

membranes, as well as reducing the damage caused by oxidative stress, being considered as markers of protein oxidation. Stamp et al.<sup>20</sup> found that 3-chloro-tyrosine, a specific hypochlorous acid biomarker, was present in proteins of the synovial fluid and was related to plasma myeloperoxidase (MPO) concentration, which was increased in patients with RA compared to healthy controls<sup>20</sup>.

### **2.3 Evidence of DNA damage in RA**

Ogawa et al.<sup>22</sup> found significantly higher levels of heptanone-etheno-2'-deoxycytidine (H $\epsilon$ dC) in the genomic DNAs from whole blood of RA patients compared to healthy controls, whereas there were no differences in the levels of 8-oxo-hydroxy-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), 1, N $\epsilon$ -etheno-2'-deoxyadenosine ( $\epsilon$ dA), and heptanone-etheno-2'-deoxycytidine (H $\epsilon$ dC). In another study<sup>23</sup>, the comet assay was used to determine DNA damage in lymphocytes and there was greater DNA damage in RA patients compared to healthy controls.

### **2.4 Evidence for alteration of the antioxidant defense system in RA**

Several studies show that RA patients have a decrease in antioxidant defense system activity compared to normal controls, as demonstrated by the following tests: ferric reduction ability of plasma (FRAP)<sup>19</sup>, reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)<sup>19</sup>, vitamin C level<sup>19</sup>, glutathione (GSH)<sup>8,19,24</sup>, superoxide dismutase (SOD)<sup>9,19,24</sup>, catalase (CAT)<sup>19,24</sup>, glutathione reductase (GR)<sup>9,19</sup>, GPx<sup>8,19</sup> and glutathione-S-transferase (GST)<sup>19</sup>. Other studies did not find difference between RA and controls in total radical trapping parameter (TRAP) assay<sup>16</sup>, GPx<sup>24</sup>, GSH (measured in erythrocytes)<sup>11</sup>, CAT<sup>11</sup>, and antioxidant capacity measured based on reduction of Cu ++ to Cu + (commercial kit)<sup>10</sup>. Finally, some studies found increased antioxidant activity in RA compared to controls in SOD<sup>21</sup>, GPx<sup>10,21</sup>, and GSH<sup>21</sup>.

## 2.5 The role of oxidative and nitrosative stress in the pathogenesis of RA

The pathogenetic role of oxidative stress in RA is well documented in numerous studies conducted over the past few decades. Of note, oxidative stress correlated with disease activity as assessed by DAS28 in most studies<sup>16,25–28</sup>. In RA, there is an increase in the production of ROS and RNS, and the majority of researchers believe that there is a decrease in antioxidant defenses<sup>9,29–31</sup>. However, in a recent systematic review, Quinonez-Flores et al.<sup>32</sup> could not conclude that the enzymatic activity of antioxidant systems is deficient in RA. Studies evaluating SOD, CAT, GPx and GR had conflicting and inconclusive results, with increased, decreased or unchanged levels having been found in RA patients compared to healthy controls<sup>32</sup>.

ROS and RNS are directly involved in cartilaginous damage. Hydrogen peroxide inhibits the synthesis of cartilage proteoglycans<sup>33</sup>. ROS and RNS can activate metalloproteases, damaging extracellular matrix components<sup>34</sup>. In addition, insufficient antioxidant enzymes could result in cartilage degradation, as demonstrated in an experimental study that evaluated the activation status of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), a transcription factor that regulates the gene expression of antioxidant enzymes. Nrf2-knockout mice demonstrated more severe cartilage injuries and greater oxidative damage compared to Nrf2-wild-type control mice<sup>35</sup>.

ROS and RNS can cause double-strand breaks and impair DNA repair mechanisms<sup>34</sup>. DNA oxidation products are elevated in leukocytes and sera from RA patients, in particular 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), which is cytotoxic and mutagenic. On the other hand, nitric oxide (NO), especially in high concentrations, causes the deamination of deoxynucleotides, rupture of DNA molecule and DNA modification by metabolically activated N nitrosamines. All these products can lead to somatic mutations<sup>34</sup>.

In RA, the rapid cellular proliferation due to the inflammatory response creates a hypoxic synovial microenvironment and increases intra-articular pressure. This leads to increased ROS production by cellular oxidative phosphorylation and induces repetitive cycling of hypoxia and reoxygenation, which may induce transcription factors that respond to oxygenation [hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and NF- $\kappa$ B]. In turn, this will lead to a spectrum of gene expression that is critical to the persistence of synovitis<sup>34,36,37</sup>.

Lipid peroxidation probably contributes to the process of accelerated atherosclerosis in RA. Persistent local and systemic inflammation promotes lipolysis, and the systemic release of fatty acids contributes to the dyslipidemia observed in RA. The oxidative stress produced by local inflammation leads to LDL oxidation, which increases adhesion molecules and cytokines<sup>34</sup>.

## 3. Methods

A bibliographic search was carried out in the electronic databases PUBMED, Lilacs, Scientific Electronic Library Online (SCIELO), and Science Direct, in English, Spanish or Portuguese. The research was limited to studies in humans, with no limit of publication date. The following combinations of MeSH terms were used: 1- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "recombinant human tumor necrosis factor-binding protein-1"; 2- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "Etanercept"; 3- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "tocilizumab"; 4- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "Antibodies, Monoclonal, Humanized"; 5- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "Abatacept"; 6- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "tofacitinib"; 7- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "Adalimumab"; 8- "Methotrexate" AND "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress"; 9- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "leflunomide"; 10- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "Sulfasalazine"; 11- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "golimumab"; 12- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "Certolizumab Pegol"; 13- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "Rituximab"; 14- "Arthritis, Rheumatoid" AND "Oxidative Stress" AND "Infliximab".

Fifteen studies, including 11 controlled clinical trials, two *ex vivo* trials and two cross-sectional studies were found. In two articles, the study of oxidative stress was not the main objective, but as the results were clearly described, these studies were used in the present review<sup>38,39</sup>. Only three studies evaluated non biological DMARDs (methotrexate and leflunomide), whereas the other 12 assessed biological DMARDs (tocilizumab and anti-TNF- $\alpha$  drugs). On the other hand, articles with sulfasalazine and abatacept that were carried out *in vitro* were not evaluated. Finally, we didn't find published articles on the effect of hydroxychloroquine, chloroquine diphosphate, certolizumab, rituximab or tofacitinib on oxidative stress. The therapeutic targets of DMARDs are shown in figure 2.

#### **4. Effect of disease-modifying antirheumatic drugs on the oxidative stress**

Studies on the effects of methotrexate (MTX), leflunomide (LEF) and tocilizumab (TCZ) are shown in Table 2, while Table 3 shows the effects of anti-TNF- $\alpha$  drugs.

##### **4.1 Methotrexate**

It is currently considered the initial drug of choice in RA, in monotherapy or in combination treatment. Its mechanism of action in RA is not fully understood. MTX is a structural analogue of folic acid and acts by inhibiting the dihydrofolate reductase (DHFR) enzyme and other folate-dependent

enzymes, such as 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase (AICAR T'ase). Inhibition of folate-dependent enzymes, especially AICAR T'ase, interferes with the ability of folic acid to serve as a cofactor for a variety of enzymes essential for the synthesis of purine and pyrimidine in cell replication, inhibiting lymphocyte proliferation, reducing accumulation of leukocytes at the inflammatory sites and interfering in the synthesis of interleukins, mainly IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ <sup>40</sup>. Other hypotheses to explain the immunosuppressive effects of MTX have been suggested: inhibition of T cell activation, induction of T cell apoptosis, alteration of T-cell cytokine expression, and activation of adenosine receptors by MTX<sup>41</sup>. In addition, the generation of ROS by MTX is important for monocyte cytoostasis and for T cell cytotoxicity<sup>42</sup>.

We found two studies evaluating markers of oxidative stress with MTX<sup>38,43</sup>. In the first, 25 patients were divided into two groups: active and non-active, according to clinical parameters. All active patients used MTX at low dose (between 7.5 and 15 mg / week) and no other immunosuppressants. Among the non-active, three were on MTX and six were not. The authors demonstrated that MTX reduced NO production only in active patients<sup>38</sup>. This study underscored the importance of MTX to selectively reduce the TH1 profile, predominant in RA, and to increase the TH2 profile (through an increase in IL-10) of cytokines in patients with active RA. The restoration of the TH2 profile is fundamental in the redox balance in patients with RA<sup>38</sup>. The second study evaluated serum and urinary pentosidines and 8-OHdG before and after three and six months of MTX treatment, with a mean dose of 5.1 mg / weeks<sup>43</sup>. There was a significant decrease in serum and urinary levels of pentosidine, a biomarker of advanced glycation end products, six months after treatment with MTX, and also a significant correlation between pentosidine levels and CRP and DAS28. 8-OHdG levels also decreased significantly after six months of treatment. This study demonstrated that MTX plays a role as a regulator against pentosidine formation and oxidative DNA damage<sup>43</sup>.

## 4.2 Leflunomide

LEF is a prodrug, which converts rapidly after the first passage into the liver in its active metabolite A77 1726, teriflunomide. A77 1726 inhibits dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), a mitochondrial enzyme that is critical for the *de novo* synthesis of pyrimidines; lymphocytes are highly dependent on this pathway for nucleotide synthesis, thus blocking cell proliferation. Pyrimidines are

also required to form the lipids and macromolecules necessary for many cellular functions<sup>44</sup>. Other mechanisms of action are: inhibition of leukocyte adhesion to vascular endothelial cells; preferential expansion of autoreactive T-lymphocytes interruption of antigen presentation by dendritic cells; and significant decrease in synovial infiltration of lymphocytes and type I synoviocytes. Teriflunomide also inhibits the secretion of IL-10 and IL-11 and reduces IL-2 synthesis, and may also increase the synthesis of TGF-beta, a cytokine which exerts a damping effect on the immune system in some settings. *In-vitro* studies have shown that A77 1726 inhibits two important transcriptional factors: tyrosine kinase activity and nuclear factor kappa B (NF-κB) and its gene expression. It also appears that A77 1726 can directly block the JAK / STAT pathway, inhibiting the production of IL-17<sup>40</sup>.

We included in this review two studies with LEF<sup>45,46</sup>. In the study of Reddy<sup>45</sup> et al., the NO measurement was performed in 30 patients with active RA at the beginning of the study and after four and eight weeks of LEF use. There was a decrease in NO levels after four weeks and this result was maintained after eight weeks. Given the importance of NO in the pathogenesis of RA, the authors concluded that inhibition of NO production may be one of the mechanisms responsible for the antirheumatic and immunomodulatory activity of LEF. The second study<sup>46</sup> (data not available in table) was performed *ex vivo* on cultured synovial cells from patients who underwent total knee arthroplasty, two had RA and two had osteoarthritis. The authors observed that A771726, in doses within the therapeutic range, showed a dose-dependent reduction of the production and release of IL1β, TNF-α, NO and metalloproteinase 3 (MMP-3) in synovial tissue culture<sup>46</sup>.

### 4.3 Tocilizumab

It is a humanized antihuman interleukin-6 (IL-6) receptor monoclonal antibody. TCZ can bind both, the soluble and membrane receptor, inhibiting classical signaling and trans-signaling in cells expressing mL-6R or gp130<sup>40</sup> (figure 2).

Two cross-sectional studies<sup>47,48</sup> evaluated TCZ with inconclusive results due to different populations. In the first study, 26, 8 and 91 patients with RA using TCZ, anti-TNF-α drugs, and non-biologic DMARDs (nbDMARDs), respectively, and 15 healthy individuals, as control group, were compared. Patients using TCZ had dramatically lower hydroperoxide levels than those using nbDMARDs. When compared to anti-TNF-α, TCZ also showed significantly lower ROS levels<sup>47</sup>. In the second cross-sectional study<sup>48</sup>, 61 patients with inactive RA using infliximab (IFX) or TCZ were studied. The aim of the study was to determine which of the two drugs most effectively suppressed ROS in patients with well-controlled RA and with normal CRP, once CRP levels could alter oxidative stress. A group of patients with active RA and a group of healthy individuals were used as controls. Oxidized albumin levels were found to be higher in active RA compared to healthy controls; in addition, patients that took TCZ, all with inactive RA, had higher oxidized albumin than healthy controls, but there was no significant difference between TCZ and IFX groups<sup>48</sup>.

Finally, a clinical trial evaluated the ROS production in monocytes and neutrophils of patients with AR<sup>39</sup> who received subcutaneous TCZ for six months. The authors concluded that TCZ can reduce the prothrombotic profile in patients with RA by restoring endothelial function, inhibiting monocytes and reducing ROS and RNS (peroxyl and peroxynitrite, respectively).

In summary, although preliminary, the results with MTX and LEF presented similar results in relation to nitrosative stress, and there was reduction of NO in three studies<sup>38,45,46</sup>. Furthermore, there were reports of decreased levels of 8-OHdG, pentosidine formation and oxidative DNA damage with MTX<sup>43</sup> and reduced production and release of IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and metalloproteinase 3 (MMP-3) in synovial tissue culture<sup>46</sup>. On the other hand, the studies with TCZ, although quite different in their objectives, verified a marked decrease of ROS in two studies<sup>39,47</sup> and of RNS in one study<sup>39</sup>. The protein oxidation of patients with inactive RA in TCZ use was elevated compared to healthy controls<sup>48</sup>.

#### **4.4 Infliximab**

It is a chimeric monoclonal antibody specific for TNF- $\alpha$  and its protein structure contains approximately 25% of murine origin and 75% of human origin. Four studies used infliximab (IFX) in patients with RA<sup>49-52</sup>.

Lemarechal et al.<sup>52</sup> evaluated 30 patients refractory to conventional therapy treated with IFX. Markers of oxidative stress were determined at the beginning of the study, six and thirty weeks after IFX infusion. Protein carbonyl content decreased and thiols measurement increased compared to a healthy control group, after six and thirty weeks of IFX infusion. In addition, PC levels were lower in patients who became inactive (DAS score <3.5) than those who remained with active disease. Although thiols levels increased 30 weeks after the use of IFX, they did not reach the healthy control baseline levels, indicating that the thiol redox system may be considered a response to the persistent low level of systemic inflammation and oxidative stress in RA patients<sup>52</sup>.

Túnez et al.<sup>49</sup> studied 12 patients with different diseases, five patients with RA, five with ankylosing spondylitis (AS) and two with psoriatic arthritis; they were divided into two groups, according to the disease activity. IFX was initiated only for patients with active disease. Oxidative stress was measured before and after six weeks of IFX onset. There was an increase in antioxidant activity in the sixth week, evaluated by SOD, catalase, CAT and GPx enzymes and by the non-enzymatic system, glutathione (GSH) in patients with active disease compared to the group control. Lipid peroxidation, assessed by 4-HNE and MDA, showed no difference after treatment between the active and non-active groups, although the active disease group presented higher levels of 4-HNE and MDA than the inactive group at the baseline. The authors concluded that oxidative stress is higher in patients with active disease and that IFX has a marked antioxidative property<sup>49</sup>.

Feijó et al.<sup>50</sup> evaluated the effect of IFX on the MPO concentration and other markers of oxidative stress in chronic joint diseases; eight patients with AS and 10 with RA. MPO can be released into the extracellular space, where it becomes cytotoxic to neighboring cells, promoting tissue and protein oxidation and catalyzing singlet oxygen production. Patients were divided into two groups according to disease activity. The results were compared to healthy controls, and only patients with active disease received IFX. On the sixth week there was a decrease in MPO, PC and an increase in antioxidant activity, evaluated by GSH, GPx, CAT and SOD, compared to the control group. The authors concluded that MPO, which is highly related to pro-inflammatory activity, may play an important role in the maintenance of oxidative stress, and that IFX decreased MPO concentration<sup>50</sup>.

Gonzalez-Gay et al.<sup>51</sup> investigated the short-term effect of IFX infusion on circulating NO levels in patients with severe RA. Plasma NO levels were measured immediately before and after infusion of IFX in 33 patients that used IFX regularly over 2 years. Following infliximab administration, serum NOx concentrations decreased immediately, demonstrating that the drug is able to reduce NO in the short term<sup>51</sup>. The cytotoxic concentrations of NO that occur due to *de novo* synthesis of inducible NO synthase (iNOS) may be one thousand times greater than that produced by endothelial NO synthase (eNOS). This increase in NO toxic concentrations is mainly due to the stimulation caused by TNF- $\alpha$  increase<sup>51</sup>.

#### 4.5 Unspecified anti-TNF- $\alpha$ medication

Two studies were found with anti-TNF- $\alpha$  medication without precise specification<sup>53,54</sup>. Cacciapaglia et al.<sup>53</sup> studied 40 patients with active RA before and after 24 and 52 weeks of subcutaneous administration of anti-TNF- $\alpha$  medication (adalimumab, etanercept or golimumab). ROS circulating levels were significantly reduced after 24 and 52 weeks. There was a significant positive correlation between the disease activity score and ROS levels. The authors concluded that TNF- $\alpha$  inhibition could control disease activity and reduce ROS circulating levels, and these factors would justify the drugs capacity to decrease morbidity and mortality in patients with satisfactory disease control<sup>53</sup>.

Biniecka et al.<sup>54</sup> studied 18 patients with inflammatory arthritis, 14 with RA and 4 with psoriatic arthritis. The authors used anti-TNF- $\alpha$  drugs but did not specify them. Synovial biopsy was performed to measure partial oxygen pressure and to perform immunohistochemical analysis of mitochondrial mutagenesis before anti-TNF- $\alpha$  therapy and after 3 months. The 4-HNE levels pre- and post-anti-TNF- $\alpha$  therapy were inversely correlated with oxygen pressure in synovial tissue (tpO<sub>2</sub>). Biological therapy responders showed significantly reduced 4-HNE expression. Elevated 4-HNE expression correlated with high DAS28-CRP scores, with 28-tender and swollen joint counts and with visual analog scale. The authors concluded that high levels of synovial oxidative stress and

mitochondrial mutation load are strongly associated with low tpO2 *in vivo* and synovial inflammation. In addition, patients who had clinical improvement with anti-TNF- $\alpha$  showed increase in tpO2, and reduction in synovial 4-HNE and mitochondrial mutation<sup>54</sup>.

#### 4.6 Adalimumab

It is a human IgG1 monoclonal antibody directed against TNF- $\alpha$ ; adalimumab binds specifically to TNF- $\alpha$ , neutralizing its biological function by blocking its interaction with surface TNF- $\alpha$  receptors, p55 and p75. Adalimumab also modulates biological responses induced or regulated by TNF- $\alpha$ , including changes in the levels of adhesion molecules responsible for leukocyte migration<sup>55</sup>. The drug induces cell lysis of surface TNF-expressing cells (in the presence of complement).

We found one clinical trial with adalimumab<sup>56</sup> that evaluated whether this anti-TNF- $\alpha$  could reduce neutrophils influx in the inflamed joint and the production of ROS, which could increase the risk of infections during TNF- $\alpha$  neutralization. Patients with active RA were randomized to receive treatment with adalimumab or placebo and healthy controls were also evaluated. Superoxide anion production by neutrophils *ex vivo* was measured before and after 14 days of treatment. There was no difference in ROS production between patients and controls before and after administration of adalimumab and it did not impair neutrophil chemotaxis to the inflamed joint<sup>56</sup>.

#### 4.7 Etanercept

It is a fusion protein of the extracellular portion of the TNF receptor type II (p75) and the Fc portion of the human immunoglobulin (Ig) G1. The resulting protein is capable of binding with high affinity to the circulating TNF- $\alpha$  and also to the TNF- $\alpha$  receptor on the target cells. In contrast to monoclonal antibodies, etanercept (ETA) does not induce either cell lysis or apoptosis of TNF- $\alpha$  expressing cells<sup>40</sup>.

Only one study evaluated the effect of ETA on oxidative stress. Kageyama et al.<sup>57</sup> studied 22 patients with RA before initiation of ETA therapy and after three and six months of use. There was a decrease in the protein oxidation, evaluated by urinary and serum pentosidines, DNA damage, evaluated by urinary 8-OHdG and also lipid peroxidation, evaluated by urinary N $\epsilon$ -hexanoyl lysine (N $\epsilon$ -HEL). Furthermore, ETA did not modify total antioxidant capacity measured by Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC). The authors concluded that ETA acts as a regulator against pentosidine formation, oxidative DNA damage and lipid peroxidation in patients with AR<sup>57</sup>.

In summary, from four studies that used IFX, three verified a decrease in protein oxidation, evaluated through the PC<sup>49,50,52</sup>, one showed reduction of nitrosative stress evaluated by NO<sup>51</sup>, one showed a reduction in MPO<sup>50</sup> and there was no change in lipid peroxidation evaluated by 4-HNE and

MDA<sup>49</sup>. However, the most significant results were found with the increase in antioxidant defenses demonstrated in three studies<sup>49,50,52</sup>, and verified by increase of thiols<sup>52</sup>, SOD<sup>49,50</sup>, CAT<sup>49,50</sup>, GPx<sup>49,50</sup> and GSH<sup>49,50</sup>. Studies with other anti-TNF- $\alpha$  drugs are still rather scarce. The use of adalimumab did not show oxidative stress alteration with its use<sup>56</sup>. In that studies in which we were unable to identify specifically which anti-TNF- $\alpha$  drug was used, in one of them, there was a decrease in ROS<sup>53</sup> and, in the other one, an inverse correlation between 4-HNE pre- and post-anti-TNF- $\alpha$  therapy and tpO2 levels, whereas biological therapy responders showed significantly reduced 4-HNE expression and elevated 4-HNE expression correlated with high DAS28-CRP scores<sup>54</sup>. Finally, the study with etanercept<sup>57</sup> showed very similar results to those obtained with MTX<sup>43</sup>, with decreased pentosidine and oxidative DNA damage, besides reduced lipid peroxidation.

## Conclusion

Many studies related to the effects of DMARDs on nitro-oxidative stress in RA accept that there is an improvement in the redox state, either by the decrease in markers of oxidation or by the increase in the antioxidant capacity.

This improvement in the redox state may be related to the success of therapy, which reinforces the concept of the interdependence between inflammation and oxidative stress. The knowledge on the pathophysiology of RA has made considerable progress in the last two decades, driven in large part by the pharmaceutical industry's investment in new drugs. Thus, there were advances that gave benefits to patients, modifying the profile of joint sequelae, comorbidities and long term outcomes. However, a proportion of patients does not reach disease remission, even though pharmacological treatment has been correctly used. In RA there consensus has not been reached on which marker or markers are better for assessing the disease. The great diversity of tests used in the studies, the heterogeneous populations regarding disease activity, duration, presence of rheumatoid factor and anti-CCP, presence of comorbidities, such as the metabolic syndrome, among other variables, make it difficult to evaluate and compare the studies. This situation is further aggravated by the evaluation of the effect of a particular drug, since ethical issues preclude the use of an isolated drug. However, oxidative and nitrosative stress markers may be useful to early evaluate the response of a drug, allowing patient stratification based on pathogenic mechanisms<sup>58</sup>, which will allow to take advantage of the therapeutic window and direct the treatment more quickly to achieve the remission of the disease.

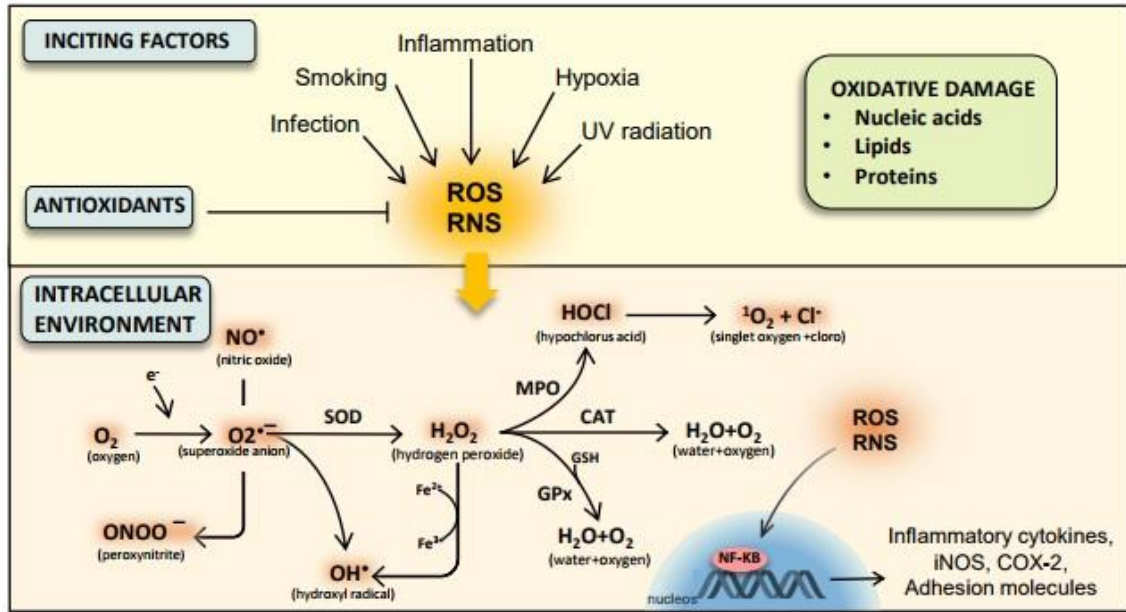
## REFERENCES

1. Listing J, Kekow J, Manger B, Burmester G-R, Pattloch D, Zink A, et al. Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNF $\alpha$  inhibitors and rituximab. *Ann. Rheum. Dis.* 2015 Feb;74(2):415–21.
2. Ahmadinejad F, Geir Møller S, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Bidkhorji G, Jami M-S. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants.* 2017 Jul 10;6(3):51.
3. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016;2016:17–19.
4. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015 Apr;4:180–3.
5. Datta S, Kundu S, Ghosh P, De S, Ghosh A, Chatterjee M. Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2014 Nov 10;33(11):1557–64.
6. Luczaj W, Gindzienska-Sieskiewicz E, Jarocka-Karpowicz I, Andricic L, Sierakowski S, Zarkovic N, et al. The onset of lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: consequences and monitoring. *Free Radic. Res.* 2016 Mar 3;50(3):304–13.
7. Yin G, Wang Y, Cen X, Yang M, Liang Y, Xie Q. Lipid Peroxidation-Mediated Inflammation Promotes Cell Apoptosis through Activation of NF- $\kappa$  B Pathway in Rheumatoid Arthritis Synovial Cells. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1–10.
8. Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int. J. Rheum. Dis.* 2011 Oct;14(4):325–331.
9. Desai PB, Manjunath S, Kadi S, Chetana K, Vanishree J. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2010 Nov;14(11):959–67.
10. Jacobson GA, Ives SJ, Narkowicz C, Jones G. Plasma glutathione peroxidase (GSH-Px) concentration is elevated in rheumatoid arthritis: a case-control study. *Clin. Rheumatol.* 2012 Nov 28;31(11):1543–7.
11. Veselinovic M, Barudic N, Vuletic M, Zivkovic V, Tomic-Lucic A, Djuric D, et al. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol. Cell. Biochem.* 2014 Jun 9;391(1–2):225–232.
12. Uchida K. Lipofuscin-like fluorophores originated from malondialdehyde. *Free Radic. Res.* 2006 Jan 7;40(12):1335–1338.
13. Thiele GM, Duryee MJ, Anderson DR, Klassen LW, Mohring SM, Young KA, et al. Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts and Anti-Malondialdehyde-Acetaldehyde Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Mar;67(3):645–655.
14. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Gebretsadik T, Ayumi S, et al. Interaction between Oxidative Stress and HDL Cholesterol Is Associated with Severity of Coronary Artery Calcification in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2010;62(10):1473–1480.
15. Kwaśny-Krochin B, Głuszko P, Undas A. Plasma asymmetric dimethylarginine in active rheumatoid arthritis: Links with oxidative stress and inflammation. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2012;122(6):270–276.
16. Costa NT, Veiga Iriyoda TM, Kallaur AP, Delongui F, Alfieri DF, Lozovoy MAB, et al. Influence of Insulin Resistance and TNF- $\alpha$  on the Inflammatory Process, Oxidative Stress,

- and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016;2016:8962763.
17. Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem. Funct.* 2006 Jul;24(4):307–311.
  18. Venturini D, Simão ANC, Dichi I. Advanced oxidation protein products are more related to metabolic syndrome components than biomarkers of lipid peroxidation. *Nutr. Res.* 2015 Sep;35(9):759–65.
  19. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One.* 2016 Apr 4;11(4):e0152925.
  20. Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Oct 1;51(10):1796–803.
  21. García-González A, Gaxiola-robles R, Zenteno-savín T. Oxidative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis. 2015;46–53.
  22. Ogawa M, Matsuda T, Ogata A, Hamasaki T, Kumanogoh A, Toyofuku T, et al. DNA damage in rheumatoid arthritis: an age-dependent increase in the lipid peroxidation-derived DNA adduct, heptanone-etheno-2'-deoxycytidine. *Autoimmune Dis.* 2013;2013:183487.
  23. Karaman A, Binici DN, Melikoğlu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis. *Mutat. Res.* 2011 Mar 18;721(1):1–5.
  24. Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A. Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology.* 2011 Sep;216(9):1010–7.
  25. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Biochem.* 2007 Mar;40(3–4):167–171.
  26. Kageyama Y, Takahashi M, Ichikawa T, Torikai E, Nagano A. Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF-alpha antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008;26(1):73–80.
  27. Shahmohamadnejad S, Vaisi-Raygani A, Shakiba Y, Kiani A, Rahimi Z, Bahrehmand F, et al. Association between butyrylcholinesterase activity and phenotypes, paraoxonase192 rs662 gene polymorphism and their enzymatic activity with severity of rheumatoid arthritis: correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress, preliminary. *Clin. Biochem.* 2015 Jan;48(1–2):63–9.
  28. Nakajima A, Aoki Y, Shibata Y, Sonobe M, Terajima F, Takahashi H, et al. Identification of clinical parameters associated with serum oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 2014 Nov 26;24(6):926–30.
  29. Ozkan Y, Yardým-Akaydın S, Sepici A, Keskin E, Sepici V, Simsek B. Oxidative status in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2007 Jan;26(1):64–68.
  30. Gringhuis SI, Leow a., Papendrecht-van der Voort E a. M, Remans PHJ, Breedveld FC, Verweij CL. Displacement of Linker for Activation of T Cells from the Plasma Membrane Due to Redox Balance Alterations Results in Hyporesponsiveness of Synovial Fluid T Lymphocytes in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* 2000 Feb;164(4):2170–2179.
  31. Blanco L, Ling S, Holoshitz J. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. In: *Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases.* CRC Press; 2014. p. 481–500.

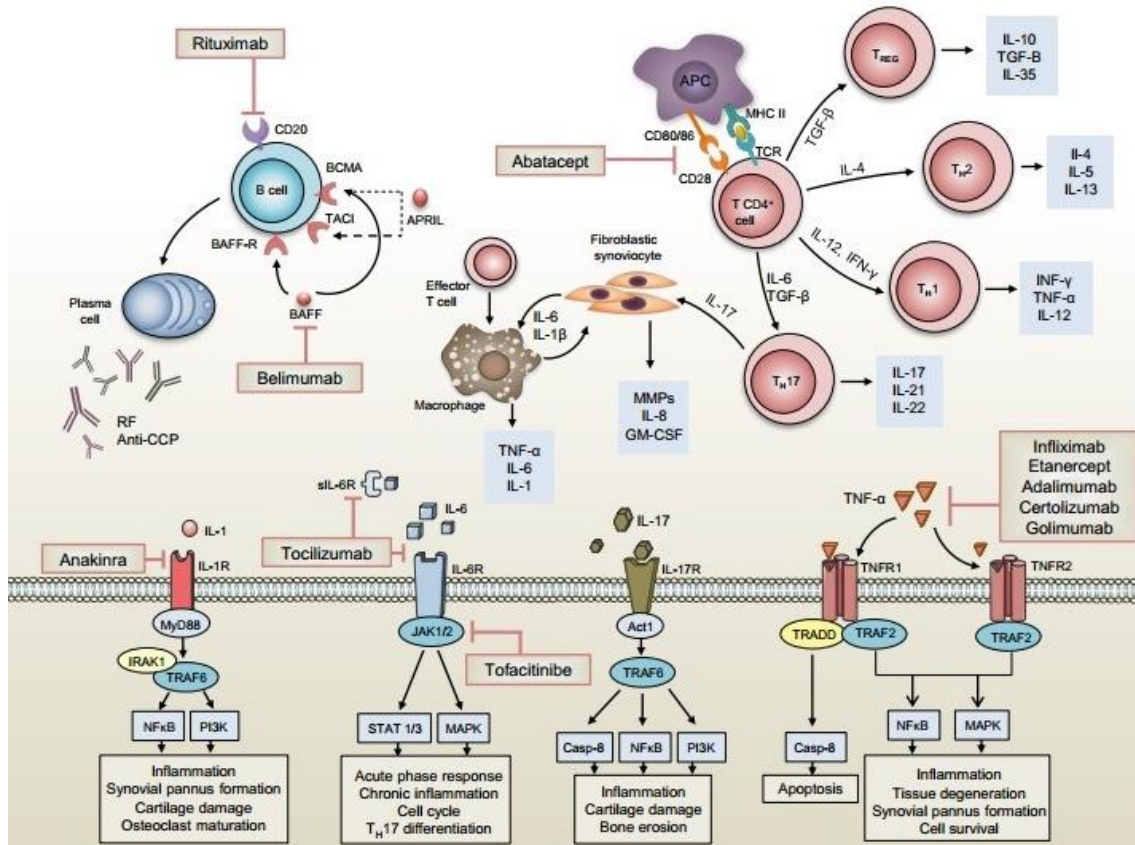
32. Quiñonez-Flores CM, González-Chávez SA, Río Nájera D Del, Pacheco-Tena C. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res. Int.* 2016;2016:6097417.
33. Schalkwijk J, Berg W van der, Putte L van de, Joosten L. An experimental model for hydrogen peroxide-induced tissue damage. Effects of a single inflammatory mediator on (peri)articular tissues. *Arthritis Rheum.* 1986;29(4):532–538.
34. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2004;6(6):265–78.
35. Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg L-O, Kan YW, Chan K, et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann. Rheum. Dis.* 2011 May;70(5):844–50.
36. Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, et al. Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am. J. Pathol.* 2004 Jan;164(1):185–92.
37. Coimbra IB, Jimenez S a, Hawkins DF, Piera-Velazquez S, Stokes DG. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 2004 Apr;12(4):336–45.
38. Herman S, Zurgil N, Langevitz P, Ehrenfeld M, Deutsch M. Methotrexate selectively modulates TH1/TH2 balance in active rheumatoid arthritis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008;26(2):317–23.
39. Ruiz-Limón P, Ortega R, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MDC, Perez- Sanchez C, Jimenez- Gomez Y, et al. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl. Res.* 2017 May;183:87–103.
40. Hochberg M, Silman A, Smolen J, Weinblatt M, Weisman M. *Rheumatology. Sixth.* Philadelphia: Elsevier Mosby; 2015.
41. Spurlock III C, Aune ZT, Tossberg JT, Collins PL, Aune P, Huston JW, et al. Increased sensitivity to apoptosis induced by methotrexate is mediated by Jun N-terminal kinase. *Arthritis Rheum.* 2011;63(9):2606–2616.
42. Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br. J. Pharmacol.* 2003 Feb;138(3):501–11.
43. Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A. Methotrexate reduces the levels of pentosidine and 8-hydroxy-deoxy guanosine in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 2007;17(5):398–402.
44. Fox RI, Herrmann ML, Frangou CG, Wahl GM, Morris RE, Strand V, et al. Mechanism of Action for Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. *Clin. Immunol.* 1999 Dec;93(3):198–208.
45. Reddy SVB, Wanchu A, Khullar M, Govindrajan S, Bambery P. Leflunomide reduces nitric oxide production in patients with active rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* 2005 Jun;5(6):1085–1090.
46. Elkayam O, Yaron I, Shirazi I, Judovitch R, Caspi D, Yaron M. Active leflunomide metabolite inhibits interleukin 1beta, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures. *Ann. Rheum. Dis.* 2003 May 1;62(5):440–443.
47. Hirao M, Yamasaki N, Oze H, Ebina K, Nampei A, Kawato Y, et al. Serum level of oxidative

- stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Rheumatol. Int.* 2012 Dec 11;32(12):4041–5.
48. Kizaki K, Yamashita F, Hayashi T, Funakoshi N. Infliximab is equivalently suppressing oxidative stress compared to tocilizumab among well-controlled patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2016 Oct 24;
  49. Túnez I, Feijóo M, Huerta G, Montilla P, Muñoz E, Ruíz A, et al. The effect of infliximab on oxidative stress in chronic inflammatory joint disease. *Curr. Med. Res. Opin.* 2007 Jun 25;23(6):1259–1267.
  50. Feijóo M, Túnez I, Tasset I, Montilla P, Pérez-Guijo V, Muñoz-Gomariz E, et al. Infliximab reduces myeloperoxidase concentration in chronic inflammatory joint diseases. *Pharmacology.* 2009 Feb 7;83(4):211–6.
  51. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Fillooy JA, Gonzalez-Juanatey C, et al. Short-term effect of anti-TNF-alpha therapy on nitric oxide production in patients with severe rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2009;27(3):452–8.
  52. Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, Kahan A, Ekindjian OGO, Borderie D. Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clin. Chim. Acta.* 2006 Oct;372(1–2):147–153.
  53. Cacciapaglia F, Grazia Anelli M, Rizzo D, Morelli E, Mazzotta D, Scioscia C, et al. Effective tumour necrosis factor-blocking therapy reduces reactive oxygen metabolite level in rheumatoid arthritis. *J. Int. Med. Res.* 2016 Sep 28;44(1 suppl):28–32.
  54. Biniecka M, Kennedy A, Ng CT, Chang TC, Balogh E, Fox E, et al. Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2011 Jul 25;13(4):R121.
  55. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* 2003 Jan;48(1):35–45.
  56. Broeder AA den, Wanten GJA, Oyen WJG, Naber T, Riel PLCM van, Barrera P. Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2003 Feb;30(2):232–7.
  57. Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A. Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2008 Jan 28;28(3):245–251.
  58. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 2015 Nov 10;23(14):1144–70.



**Figure 1: Generation of reactive oxygen and nitrogen species and antioxidant systems.** Reactive oxygen species are produced during the normal aerobic cell metabolism; 85% to 90% of the oxygen ( $O_2$ ) consumed is metabolized in mitochondria by the electron transport chain and the remaining 10% to 15% are used by several oxidases and oxygenases enzymes and by direct oxidation chemical reactions. The superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) produced by several sources act as a primary reactive specie.  $O_2^{\bullet-}$  reacts rapidly with nitric oxide ( $NO^{\bullet}$ ) to produce peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) or is catalyzed by superoxide dismutase (SOD) to produce hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  can be neutralized by catalase or glutathione peroxidase. However, in the presence of transition metal ions, such as iron ( $Fe^{2+}$ ) and copper ( $Cu^+$ ), highly toxic hydroxyl free radicals ( $OH^{\bullet}$ ) can be produced from  $H_2O_2$  (Fenton reaction). ROS can act as a second messenger to activate the nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B), which orchestrates a spectrum of gene expression involved in the inflammatory response and transcription of proinflammatory cytokines. CAT: catalase; COX-2: cyclooxygenase-2; e<sup>-</sup>: unpaired electron;  $Fe^{2+}$ : ferrous ion; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione; iNOS: inducible nitric oxide synthase; MPO: myeloperoxidase; NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B; RNS: reactive nitrogen species; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase.

Adapted from: Biswas, 2016<sup>3</sup>



**Figure 2: Pathogenesis of rheumatoid arthritis and therapeutic targets.** In the genetically susceptible individual, an environmental trigger enters the mucosa, stimulating an innate cellular immune response, with activation of neutrophils, dendritic cells and macrophages. Protein modification (citruination); the citrullinated antigens are processed and presented by the antigen-presenting cells (APCs) to T cells, which are activated and, in turn, activate B cell, leading to the production of autoantibodies. The arthritis phase begins with the infiltration of leukocytes in the synovium due to endothelial activation, which increases the expression of adhesion molecules and chemokines. APCs present antigen to T lymphocyte by interaction of the MHC with T cell receptor (TCR). Activation of T lymphocyte only occurs after a costimulatory signal mediated by the interaction of CD28 on T lymphocytes with CD80 / 86 in APC. The activated macrophage produces several proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF - $\alpha$ ), interleukin (IL) -1 and IL-6, which increase the expression of adhesion molecules. The activated T cell can differentiate into several phenotypes, such as T-helper 17 (Th17), which are dependent on IL-6 stimulation and produce IL-17. TNFRSF proteins that utilize TRAFs are proinflammatory and induce proliferation, differentiation and production of inflammatory mediators besides anti-apoptotic function. These processes can be induced through NF- $\kappa$ B and MAP kinase cascades activation. TRADD proteins can recruit TRAF proteins or activate death pathways through caspase 8, inducing apoptosis. In addition to blocking TNF- $\alpha$ , other therapeutic targets have been shown to be effective: antibody anti IL-6 receptor (tocilizumab), an IL-1 antagonist and a small molecule that inhibits JAK (tofacitinib) signaling, inhibition of T cell co-stimulation (abatacept), and depletion of B cells with anti-CD20 antibody (rituximab). JAK: Janus Kinase ; STAT: Signal Transducers and Activator of Transcription; TRAF: Tumor necrosis factor receptor-associated factor; TRADD: Tumor necrosis factor receptor-associated death domain; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase.

Table 1: Most commonly used oxidative and nitrosative stress markers

lipid peroxidation	protein oxidation	DNA damage	ROS	RNS	enzymatic antioxidants	non-enzymatic antioxidants	total antioxidant capacity
MDA	protein carbonyl	8-OHdG	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO	CAT	glutathione	TRAP
4-HNE	AOPP		ONOO	3-nitrotyrosine	SOD	Q10 coenzyme	FRAP
hydroperoxides			ROO <sup>•</sup>		GPx	uric acid	ORAC
isoprostanes					GR	E vitamin	TEAC
<b>SH group</b>							

4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal; 8-OHdG: 8-hydroxy-deoxy guanosine; AOPP: advanced protein oxidation products; CAT: catalase; FRAP: ferritin-reducing antioxidant power; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; MDA: malondialdehyde; ORAC: oxygen-radical absorbance capacity; TEAC: Trolox-equivalent antioxidant capacity; TRAP: total radical antioxidant parameter; SOD: superoxide dismutase

Table 2: Effects of synthetic (MTX and LEF) and biological (TCZ) disease-modifying antirheumatic drugs on nitro-oxidative stress in humans.

Design	Drug	n	age (years±SD)	Dur.(years±SD)	Disease activity score	Nitro-oxidative stress markers
Cross-sectional study, <i>ex vivo</i> .	MTX	16 active 9 inactive	nr	nr	In order to classify patients in active or inactive disease, clinical criteria were used (morning stiffness, fatigue, pain and joint edema) and ESR	Monocytes derived from active RA showed: NO ↓ ROS ↑ after in vitro treatment with M
Non-randomized clinical trial.	MTX	19	58±12	11.2±7.6	DAS28 T0 5.23±0.70 T90 4.3±0.73 √ T180 4.09±0.70 √	Pent ts , Pent fu: T90 √ ; T180 √ Pent tu : T90 * ; T180 √ 8-OHdG Urinary :T90 *; T180
Uncontrolled randomized clinical trial.	LEF	30	40±8	3.62±3.7	DAS28 T0, T28, T56: nr	nitrites and citrulline T28 √ T56 √
Non-randomized clinical trial.	TCZ	20	48±2	7.6±1.76	DAS28 T0:4.25±0.18 T180: 2.90±0.42 √	ONOO ROO' T0 T180 √
Cross-sectional study	TCZ	nbDMARD: 91 anti-TNFα: 8 TCZ: 26 control: 15	63 ± 12 59 ± 4 58± 8 68 ± 15	12.6 ± 10.7 10.3 ± 4.5 13.0 ± 8.5	CRP comparison with group nbDMARD: anti-TNFα: ↓ TCZ: ↓	d-ROM comparison with group nbDMARD: anti-TNFα: ↓ TCZ: ↓ contr: ↓
Cross-sectional study	TCZ	IFX: 33 TCZ: 28 controls: 10 active RA 10 healthy 10 OA	65 ± 11 62 ± 14 69 ± 9 65 ± 10 67±10	20 ± 13 18 ± 11 nr	DAS28 IFX:1.75 ± 0.70 TCZ: 2.14 ± 0.83 active RA:4.24 ± 0.91	Oxidized albumin comparison with control: IFX: ↑ ; TCZ: ↑ active RA: ↑ IFX vs TCZ: *

\* no significant difference; ∆: significantly elevated levels in comparison with T0; √: significantly diminished levels in comparison with T0; †: significantly elevated levels in comparison with control group in T0; ↓ significantly diminished levels in comparison with control group in T0; 4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal; anti-TNF-α: inhibitor of tumor necrosis factor α; CAT: catalase; DAS28: disease activity score 28 joints; DAS44: disease activity score 44 joints; Dur: duration of illness; ROS: reactive oxygen species; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione; IFX: infliximab; MDA: malondialdehyde; MPO: myeloperoxidase; MTX: methotrexate; NO: nitric oxide; nr: not reported in the article; Nε-HEL: Nε-hexanoyl lysine; O2<sup>-</sup>: superoxide anion; Pent ts: total serum pentosidine; Pent fu: free urinary pentosidine; Pent tu: total urinary pentosidine; PMA: serum treated with phorbol myristate acetate; PsA: psoriatic arthritis; RA: rheumatoid arthritis; Ref: reference; ROM: reactive oxygen metabolites; T0: before the start of therapy; T28: 4 weeks after initiation of therapy; T56: 8 weeks after initiation of therapy; T90: 3 months after initiation of therapy; T180: 6 months after initiation of therapy.

Table 3: Effects of biological (TNF-α inhibitors) disease-modifying antirheumatic drugs on nitro-oxidative stress in humans.

Design	Drug	n	age (years±SD)	Dur.(years±SD)	Disease activity score	Nitro-oxidative stress markers
Non-randomized clinical trial	IFX	7 active 5 inactive 3 controls	44 ± 14 46 ± 9 nr	nr	DAS 28 (active) T0: 5.6 ;T42: 3.4 DAS28 (inactive) T0: 2.4 BASDAI (active) T0: 7.1 ; T42: 3.3 BASDAI (inactive) T0:3.8	4-HNE + MDA: T42* PC: T42↓** GSH: T42 ↑** CAT: T42 ↑** SOD: T42 ↑** GPx: T42 ↑**
Controlled clinical trial	IFX	11 active 7 inactive 12 controls	47±14 56±18 35±12	nr	nr	MPO: T42 ↓ PC: T42 ↓ GSH: T42 ↑ GPx: T42 ↑ CAT: T42 ↑ SOD: T42 ↑
Non-randomized clinical trial	IFX	33	55 ± 13	12.3 ± 7.5	DAS 28: 4.4 ± 1.1	nitrates and nitrites ↓ Pre and post infusion

Controlled clinical trial	IFX	30 RA 20 AS 30 controls	51 ± 16 41 ± 12 46 ± 17	13 (1-30)	DAS44 T0: 7.7 (4.6–11.8); T42 e T210: nr	CP: T42 ↓ e T210 ↓ Thiols: T42 ↑ e T210 ↑
Non-randomized clinical trial	anti-TNF-α	40	53 ± 13	0.56 ± 0.3	T0 DAS28 6.4 ± 0.9 T168: 50% of patients reached DAS28 < 3.2 T364: 62.5% of patients reached DAS28 < 3.2	d-ROM T168: √ T364: √
Non-randomized clinical trial	anti-TNF-α	n=18 responders 7 non responders: 11	nr	nr	responders: T0 DAS28 4.5 T90 DAS28 3.0 √ no responders: T0 DAS28 3.0 T90 DAS28 3.5*	4HNE: responders: T90 √ non responders: T90*
Randomized clinical trial	ADA	21 ADA 8 placebo 25 control	55 ± 12 57 ± 10 nr	13 ± 8 9 ± 6	T0 ADA DAS44: 5.4 ± 0.8 placebo DAS44: 5.3 ± 0.9 T14: DAS 44 nr, but all ADA and no placebo met EULAR response criteria after 14 days.	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> T0: under non-stim conditions and after STZ was no difference; after RA > controls T14: *
Non-randomized clinical trial	ETA	22	62 ± 9	15.3 ± 7.4	T0 DAS 28: 4.74 ± 0.93 T90 DAS 28: 2.85 ± 0.71 T180 DAS 28: 3.00 ± 1.07	Nε-HEL Urinary: T90 √, T180 √ Pent ts: T90*, T180 √ Pent tu: T90*, T180* Pent fu: T90 √, T180 √ 8-OHdG u: T90*, T180 √ TEAC: T90*, T180*

\* without significant difference; \*\* only in active group vs. controls; ^ : Increased in comparison to T0; √: decreased in comparison to T0; ↑: increased in the disease group compared to the control group in T0; ↓ decreases in the disease group compared to the control group in T0; 4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal; 8-OHdG: 8-hydroxy-deoxy guanosine; ADA: adalimumab; anti-TNF-α: inhibitor of tumor necrosis factor α; AS: ankylosing spondylitis; BASDAI: Bath Ankylosing spondylitis Disease Activity Index; CAT: catalase; CRP: C-reactive protein; contr: controls; DAS28: disease activity score 28 joints; Dur.: duration of illness; ETA: etanercept; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione; IFX: infliximab; MDA: malondialdehyde; MPO: myeloperoxidase; NO: nitric oxide; nr: not reported in the article; Nε-HEL: ne-hexanoyl lysine; OA: osteoarthritis; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superoxide anion; PC: protein carbonyl; Pent st: total serum pentosidine; Pent ul: free urinary pentosidine; Pent ut: total urinary pentosidine; RA: rheumatoid arthritis; Ref.: reference; ROM: reactive oxygen metabolites; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase; STZ: serum treated with zymosan; T0: before the start of therapy; T14: 14 days after initiation of therapy; T42: 6 weeks after initiation of therapy; T90: three months after initiation of therapy; T168: 24 weeks after initiation of therapy; T180: six months after initiation of therapy; T210: 30 weeks after initiation of therapy; T364: 52 weeks after initiation of therapy; TEAC: Trolox-equivalent antioxidant capacity; tpO<sub>2</sub>: oxygen pressure in synovial tissue.

## **Metabolic Syndrome and the Decreased Levels of Uric Acid by Leflunomide Favor Redox Imbalance in Patients with Rheumatoid Arthritis**

### **Rheumatoid Arthritis and Oxidative Stress**

Neide Tomimura Costa<sup>1,2</sup>, Bruna Miglioranza Scavuzzi<sup>1</sup>, Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda<sup>3</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>4</sup>, Daniela Frizon Alfieri<sup>1</sup>, Fabiano Aparecido de Medeiros<sup>5</sup>, Marcelo Cândido de Sá<sup>5</sup>, Pâmela Micheletti<sup>5</sup>, Bruno Alexandre Sekiguchi<sup>1</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>4</sup>, Michael Maes<sup>6</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>4\*</sup>, Isaias Dichi<sup>2</sup>

1. Laboratory of Research in Applied Immunology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
2. Department of Internal Medicine – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
3. Department of Rheumatology – PUC, Pontifícia Universidade Católica, Londrina, Paraná,
4. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
5. Post Graduate Program in Clinical and Laboratory Pathophysiology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
6. IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, VIC, Australia.

\*Corresponding author: Andrea Name Colado Simão, PhD. Department of Clinical Pathology. Robert Koch Avenue nº 60 Bairro Cervejaria, University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440 Tel: (55) 43 3371 2321 E-mail: [deianame@yahoo.com.br](mailto:deianame@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

Oxidative stress plays a role in the pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA). The aim of the present study was to verify the influence of metabolic syndrome (MetS) and Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (DMARD) on nitrosative and oxidative biomarkers in patients with rheumatoid arthritis (RA). 177 patients with RA and 150 healthy volunteers participated in this study, which measured lipid hydroperoxides, advanced oxidation protein products (AOPP), nitric oxide metabolites (NO<sub>x</sub>), carbonyl protein, total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), uric acid (UA), and C-reactive protein (CRP). **Results:** NO<sub>x</sub> and the NO<sub>x</sub>/TRAP ratio were significantly increased in RA, whilst no significant differences in lipid hydroperoxides, AOPP, UA and TRAP levels were found between both groups. Treatment with leflunomide was associated with increased levels of carbonyl protein, and lowered levels in TRAP and UA, whilst the NO<sub>x</sub>/TRAP ratio further increased. NO<sub>x</sub> and the NO<sub>x</sub>/TRAP ratio were significantly higher in women than men, whilst TRAP and UA were significantly lower in women. MetS was accompanied by increased AOPP and UA levels. RA was best predicted by increased NO<sub>x</sub>/TRAP ratio, CRP and BMI. In conclusion, our data demonstrated that NO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub>/TRAP are strongly associated with RA pathophysiology. Our findings suggest that inhibition of iNOS may become an interesting therapeutic approach for the treatment of RA. In addition, the presence of MetS and decrease in levels of UA by leflunomide favor redox imbalance in RA patients. More studies are needed to evaluate the impact of antioxidant capacity reduction on RA progression.

**Keywords:** rheumatoid arthritis; oxidative stress; nitrosative stress; metabolic syndrome, leflunomide.

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a disabling autoimmune inflammatory disease characterized by a chronic involvement of the synovial joints that may lead to joint destruction and functional decline [1]. Sera, plasma and synovial fluids of RA patients show increased oxidative enzyme activity, decreased antioxidant capacity as well as increased markers of oxidative damage, indicating a pathogenic role of oxidative stress in RA [2]. The role of oxidative stress has been demonstrated in the pathogenesis of RA by the increase in hydrogen peroxide, which inhibits the synthesis of cartilage proteoglycans [3,4]. Moreover, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) can activate metalloproteases, damaging components of the extracellular matrix [5,6] and affect DNA, preventing repair mechanisms [7] and activating osteoclasts [8]. Studies have shown that oxidative stress correlates with disease activity, as measured by the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and C-reactive protein (CRP) [9]. Although there are few studies reporting the effects of drug treatment on oxidative stress in patients with RA, most are able to demonstrate that the reduction in disease activity after drug therapy is associated with reduced indices of oxidative stress and inflammation [10–12]. Furthermore, studies have demonstrated that the pro-inflammatory milieu and oxidative stress favor detrimental changes in metabolism [13]. Accordingly, the presence of metabolic syndrome (MetS) has been shown to correlate with activity disease in patients with RA [14].

Nitric oxide (NO) and its metabolites are biomarkers of nitro-oxidative stress [15]. NO is a signaling molecule that plays a key role in the pathogenesis of RA as it participates in bone reabsorption and destruction of connective tissue in joints [16]. NO levels are increased in patients with RA and are correlated with disease activity and inflammatory cytokines [17,18]. Drugs showing a clinical efficacy for the treatment of RA may inhibit NO production [16]. Leflunomide, an anti-rheumatic drug, may decrease the expression of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ , and reduce levels of serum malondialdehyde explaining its immunomodulatory and anti-rheumatic effects [19].

Previous studies have also demonstrated the involvement of uric acid (UA) in physiopathology of RA [20,21]. A growing body of evidence shows that UA is a potent inducer of inflammation and is involved in redox imbalance [22–24]. However, UA has a dual role, with an extracellular protective antioxidant effect and an intracellular pro-oxidant effect [25,26]. Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (DMARD) commonly used in the treatment of arthritis, such as leflunomide and methotrexate, decrease UA levels [27,28]. Nevertheless, the role of UA in inflammatory responses in RA remains a matter of debate. Furthermore, it has been demonstrated

that increased UA is an independent predictor of cardiovascular diseases and all-cause mortality and could predict the development of MetS [29]. Several components of MetS such as waist circumference, fasting glucose, fasting insulin, insulin resistance and hypertension are significantly associated with hyperuricemia, while high density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) is inversely associated with serum UA concentrations [29,30].

Given the important role of prooxidant-antioxidant balance in the pathophysiology of RA, the primary aim of the present study was to verify the influence of MetS and DMARD on nitrosative and oxidative biomarkers in patients with RA. These associations could increase our understanding of physiopathology and could help to identify new therapeutic targets in RA.

## **METHODS**

### ***Subjects***

A total of 327 individuals were selected from among rheumatology ambulatory patients and volunteers of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil to participate in the study. The study included 177 patients with RA and 150 healthy volunteers. RA was diagnosed using the American College of Rheumatology (ACR)/ European League Against Rheumatism (EULAR) 2010 revised criteria [31]. Inclusion criteria were patients (both genders) aged from 18 to 65 years. Exclusion criteria were thyroid, adrenal, renal, hepatic, gastrointestinal, infectious, oncological or other autoimmune disease, hormone replacement therapy and antioxidant supplements. Information on medical history was obtained at clinical evaluation. Disease duration and drugs were recorded for each patient. The individuals of both groups did not drink alcohol regularly.

### ***Ethics, consent, health and safety***

The Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil approved all procedures involving human participants. This clinical investigation was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. All mandatory laboratory health and safety procedures have been complied.

### ***Anthropometric and blood pressure measurements***

Body weight was measured to the nearest 0.1 kg in the morning by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing and no shoes. Height was measured to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Waist circumference (WC) was measured on standing subjects midway between the lowest rib and the iliac crest. Three blood pressure measurements using a calibrated sphygmomanometer were taken with a 1-min interval after the participant had been seated were recorded on the left arm. The mean of these measurements was used in the analysis.

MetS was defined following the Adult Treatment Panel III criteria, where MetS is present if three or more of the following five criteria are met: 1) waist circumference over 94 cm in men and 80 cm in women, 2) fasting triglyceride levels greater than or equal to 150 mg/dl, 3) high density lipoprotein (HDL) lower than 40 mg/dl in men or 50 mg/dl in women; 4) blood pressure over 130/85 mmHg (or antihypertensive medication use), and 5) fasting glucose levels greater than or equal to 100 mg/dl or the use of antidiabetic medication [32].

### ***Biochemical and immunological biomarkers***

After fasting for 12 hours, venous blood was withdrawn in Ethylene Diamine Tetra acetic acid (EDTA) and BD Vacutainer® UltraTouch™ serum sterile tubes. Whole blood was allowed to stand for 30 min and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Plasma and serum samples were separated and divided into aliquots and then stored at -80°C for subsequent analysis. Serum C-reactive protein (CRP) levels were measured using a turbidimetric assay (C8000, ABBOTT, Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Total cholesterol, HDL, low-density lipoprotein, triacylglycerol, glucose and UA were evaluated by a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA) using Dade Behring® kits.

### ***Oxidative and Nitrosative stress measurements***

Lipid hydroperoxides were evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH), as previously described [33], and the results were expressed in relative light units (RLU).

Carbonyl protein content was measured as described by Reznick and Parker [34]. Carbonyl content was calculated by reading the peak absorbance of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) treated samples and compared

with samples treated with only hydrochloric acid. Carbonyl content was expressed in nanograms per milliliter total protein.

Advanced oxidation protein products (AOPP) indicate damage to proteins resulting from the oxidation of amino acid tyrosine residues of the plasma proteins such as albumin, fibrinogen and lipoproteins [35]. AOPP were determined in the plasma using the semi-automated method [35]. AOPP concentrations were expressed as micromoles per liter ( $\mu\text{mol/L}$ ) of chloramine T equivalents.

Nitric oxide (NO) concentration in sample was estimated by measuring nitric oxide metabolites nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) using cadmium beads for the reduction of nitrate to nitrite. The concentrations of these metabolites were later determined according to the method proposed by [36]. The values  $\text{NO}_x$  values were expressed in  $\mu\text{M}$ .

The total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as reported previously. This method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2- aminopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog Trolox, and the values of TRAP were expressed in equivalent of  $\mu\text{M}$  Trolox/mg [37].

### *Statistics*

The sample size was estimated statistically using GPower indicating that using a power of 0.80, at  $\alpha < 0.05$  level, and with an effect size of 0.15 (based on mean and standard deviation for some of the parameters previously evaluated in other studies), the study sample for analysis of covariance (2 groups) should be around 351. Therefore, 177 patients and 150 controls were included. Analyses of variance (ANOVAs) or the non-parametric Mann-Whitney U test were employed to check differences among groups in continuous variables. Analyses of contingency tables ( $X^2$ -test) were used to check associations between categorical variables. Multivariate general linear model (GLM) analyses were used to assess the multivariate effects of explanatory variables (including diagnosis) on dependent variables (including O&NS biomarkers), while controlling for sex, age, BMI and metabolic syndrome. Tests for between-subject effects were employed to assess the effects of significant predictor variables on the dependent variables. Estimated marginal means ( $\pm\text{SE}$ ) were computed to interpret the inter-group differences between categorical independent variables and parameter estimates were used to interpret the direction and impact of continuous independent variables. Automatic stepwise binary logistic regression analyses were used to delineate the most significant explanatory variables predicting RA

(controls as reference group) using the following explanatory variables: O&NS biomarkers, age, MetS, BMI with or without immune biomarkers. Some O&NS biomarkers were Ln transformed (LOOH, AOPP, NOx) to normalize their distribution (assessed using the Kolmogorow-Smirnov test). We also used the z transformed scores for the biomarkers to display the differences among groups and to compute z-unit weighted composite scores, including an index of oxidative damage as z value of AOPP (zAOPP) + zLOOH (zAOPP+LOOH); zNOx – zTRAP indicating NO metabolism versus antioxidant defenses zNOx/TRAP). All regression results were checked for multicollinearity using VIP and tolerance. All statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 22. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results.

## RESULTS

### Descriptive statistics

**Table 1** shows the socio-demographic and biomarker data of the RA patients and controls included in the present study. The authors did not use p-corrections to address false discovery rate because the univariate statistical results presented in table 1 (and the intercorrelation matrices among variables) were employed to define the independent variables, which were used as determinants of independent association with the dependent variables in the ultimate multivariate analyses shown in tables 2-4. Moreover, the results presented in Table 1 were not controlled for different confounding variables (see tables 2-4). Nevertheless, there were differences in sex ratio and age between the two study groups with RA patients showing more females and a higher age as compared to normal controls. RA patients also showed somewhat more subjects with MetS and higher BMI than controls. There were significantly more Caucasians than non-Caucasians (self-declared ethnicity) in the control group. Therefore, we have controlled all statistical analyses for possible effects of age, sex, MetS and BMI on the biomarkers by using these confounding variables as additional explanatory variables (self-declared ethnicity did not have any significant effects and therefore these data are not shown). There were significant differences in CRP, NOx, carbonyl protein, TRAP and UA between the two study groups. There were no significant differences in AOPP and LOOH between the study groups. Also, the oxidative stress index zAOPP+LOOH was somewhat higher in RA patients than in controls. The ratio zNOx/TRAP was significantly higher in patients than in controls.

### Effects of medication

Some patients were treated with drugs, including methotrexate (n=121), TNF inhibitors (n=40), prednisone (n=122), leflunomide (n=77) and antimalarials (n=70). In order to examine the effects of the drug state on the biomarkers we have first carried out multivariate GLM analyses (in the patient subsample) with eight O&NS biomarkers (AOPP, LOOH, NO<sub>x</sub>, carbonyl, TRAP, UA, zAOPP+LOOH and zNO<sub>x</sub>/TRAP) as dependent variables and MetS and the abovementioned medications as explanatory variables. If significant in this multivariate GLM analysis, we further examined the differences between three subgroups using univariate analyses on the separate biomarkers, namely RA patients using the drug *versus* RA patients not using the drug *versus* controls. **Table 2**, regression #1 shows the results of this multivariate GLM analysis performed in the patients only. We found that MetS and leflunomide had a significant impact on the biomarkers. Tests for between-subject effects showed significant effects of leflunomide on NO<sub>x</sub> (increased), TRAP (lowered), UA (lowered) and the zNO<sub>x</sub>/TRAP ratio (increased). The other treatments had no significant effect on the biomarkers. Consequently, all results of univariate analyses were corrected for use of leflunomide by using RA divided into two groups according to use of leflunomide *versus* controls.

#### **Differences between diagnostic groups**

Table 2, regression #2 shows the results of a multivariate GLM analysis with the 8 biomarkers as dependent variables and diagnostic groups (RA patients using leflunomide *versus* RA patients not using this drug *versus* controls) as primary predictor variable, while controlling for MetS, age, sex and BMI. We found a highly significant effect of diagnosis on the biomarkers after adjusting for the confounding variables. Univariate GLM analyses showed that AOPP was strongly associated with MetS only. **Table 3** shows the estimated marginal mean values of the dependent variables obtained by GLM regression analyses, showing that AOPP was significantly higher in those with MetS as compared to subjects without MetS. Table 2 shows that a large part of the variance in NO<sub>x</sub> levels was explained by diagnosis (28.6%) and sex (5.2%). Table 3 (and protected pair-wise comparisons among treatment means) shows that NO<sub>x</sub> levels were significantly higher in RA patients (independently from drug intake) as compared to controls and higher in females than in males. There was a significant although modest effect (4.2% of the variance) of diagnosis on carbonyl protein. Estimated marginal means and protected post-hoc analysis showed significantly higher carbonyl protein in patients who were treated with leflunomide as compared to controls, whereas patients without those drugs occupied an intermediate position and did not differ from controls (p=0.443) or those who were treated (p=0.100). **Table 2** shows that diagnosis explained around 10.7% of the variance in TRAP levels, while also BMI and sex contributed significantly to the variance, but with less impact. **Table 3** shows that TRAP levels were significantly lower in

RA patients treated with leflunomide as compared to controls and RA patients without leflunomide, while TRAP was significantly higher in males as compared with females. There were no significant differences in TRAP between controls and RA patients without use of leflunomide ( $p=0.279$ ). Parameter estimates showed that BMI was positively associated with TRAP levels. UA was strongly predicted by diagnosis, MetS, BMI and sex. Estimated marginal means and protected post-hoc analyses showed that UA was significantly lower in patients treated with leflunomide as compared to the two other study samples. Those with MetS and males showed significantly higher UA levels as compared to their counterparts. Parameter estimates showed that BMI was significantly correlated with UA. The zAOPP+LOOH index was significantly higher in those with MetS than in those without MetS. The zNOx/TRAP ratio was significantly associated with diagnosis (around 40.8% of the variance) and sex. Estimated marginal means show that this ratio was significantly different between the three groups and increased from controls to RA patients without leflunomide to those who were treated. The ratio was also higher in females than in males.

**Table 4** shows the results of stepwise automatic binary logistic regression analyses with RA as dependent variable (and controls as reference group). We used the residualized zNOx/TRAP values after regression on use of leflunomide and sex and the residualized zAOPP+LOOH values obtained by the regression on MetS. Regression #1 shows that RA was significantly predicted ( $X^2=25.20$ ,  $df=1$ ,  $p<0.001$ , Nagelkerke=0.143) by the residualized zNOx/TRAP, age, BMI (all positively) and residualized zAOPP+LOOH (inversely). A much better prediction was obtained by entering CRP in the analysis. Thus, regression #2 shows that RA was significantly predicted ( $X^2=85.30$ ,  $df=4$ ,  $p<0.001$ , Nagelkerke=0.515) by the residualized zNOx/TRAP values, CRP, BMI and age (both positively) combined. 79.5% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 72.75% and a specificity of 84.8%.

## DISCUSSION

The major finding of this study is that increased NOx levels and an increased NOx/TRAP ratio are highly associated with RA. In addition, sex, MetS, and leflunomide are important factors to alter redox balance in patients with RA. Although the classical diagnosis of RA is well established by other means, a model

constituted by zNOx/TRAP ratio, CRP, age and BMI demonstrated high sensitivity and specificity, what shows the involvement of these parameters in the physiopathology of RA.

Regarding nitrosative and oxidative stress markers, our results show that there is a highly significant positive association between NOx and NOx/TRAP and RA (AC ROC > 90.0%). Circulating NOx reflects constitutive endothelial nitric oxide synthases activity and when the production is excessive, a dysregulation of T cell function may occur [38,39]. Nagy et al. [40] reported that T cells from RA patients produced over 2.5 times more NO than healthy donor T cells. Furthermore, other studies have consistently shown increased NOx in serum and/or synovial fluids of patients with RA and that the increased levels correlate with clinical manifestations of the disease, such as morning joint stiffness and the number of tender or swollen joints, which suggests that NO plays a key role in RA pathogenesis [17,39,41,42]. Inhibition of *iNOS* has been studied in RA as it attenuates arthritis, inhibits apoptosis and cytokine production, suggesting that inhibition of *iNOS* may become an interesting therapeutic approach for the treatment of RA [43]. We found that women with RA have higher levels of NOx than men with RA. To the best of our knowledge, this is the first report describing sexual dimorphism in nitro-oxidative stress biomarkers in patients with RA, which could at least partially explain why RA is more severe in women [44]. We proposed a highly sensitive and specific model predicting RA diagnosis, in which zNOx/TRAP ratio, CRP, age and BMI correctly classified RA patients. These results indicate that nitro-oxidative stress and antioxidant defenses are interesting drug targets. Nevertheless, the prediction model should be tested in an external cohort to truly determine the added value of this diagnostic tool.

Our findings also indicate that MetS and BMI have a significant impact on nitro-oxidative biomarkers. MetS is generally defined as a complex disorder represented by a combination of risk factors such as central obesity, dyslipidemia, hypertension, and disturbed glucose metabolism leading to an increased risk of coronary heart disease, other types of cardiovascular atherosclerotic diseases, and type two diabetes (T2D) [45]. It is well established that visceral fat contributes to systemic inflammation and that this condition is a promoter of oxidative stress, both of which favor disease progression [46].

Our results do not show that protein carbonyl groups are higher in patients with RA than in control subjects after adjusting for the effects of leflunomide. Lemarechal et al. [47] found higher protein carbonyl groups in patients with RA. Carbonylated proteins are early products of protein oxidation - particularly the amino acids lysine, arginine, proline and threonine - that circulate for longer periods in the blood, when compared to lipid peroxides [47,48]. Moreover, AOPP, an end product of protein oxidation, did not differ between RA patients and controls, but was significantly increased in the presence of MetS. This finding confirms

our previous report on the robust relationship between AOPP and all the components of the MetS [49]. Although we are not aware of any study, which have reported AOPP levels in RA patients with concomitant MetS, few studies have evaluated AOPP in plasma or serum of patients with RA and the results have been conflicting. Baskol et al. [50] found higher AOPP levels in patients with RA and that these oxidation products were higher in active disease. Leitemperguer et al. [51] found no significant differences between AOPP levels in RA patients and the control group, whilst Costa et al. [52] found lower AOPP levels in RA patients than in healthy controls. Thus, our data demonstrate that increased NO production rather than protein oxidation is associated with RA.

Interestingly, there were no disorders in oxidation as measured with LOOH, protein carbonyls and AOPP, which contrast to other autoimmune inflammatory diseases, such as systemic lupus erythematosus [53] and multiple sclerosis [54]. Markers of lipid peroxidation have yielded mixed results, having been increased in patients with RA in most [55–57] but not all [58,59] investigations. Our data agree with a previous study [52], which also found no differences of lipid peroxidation between patients with AR and healthy controls. Researchers have found that increased oxidant stress may lead to compensatory changes in the concentration of antioxidants, such as vitamin E, glutathione and ceruloplasmin, which could result in protection against lipid peroxidation in RA patients [60,61].

Although compensatory mechanisms of antioxidant defenses may occur, there is evidence that antioxidant defenses are unable to cope with excessive oxidative stress in RA patients. TRAP and several other markers of impaired antioxidant capacity have been reported in RA [59,62]. In our study, however, we found only a trend toward decreased levels of TRAP and UA in RA. TRAP evaluates mainly the non-enzymatic antioxidants UA, ascorbic acid, and alpha-tocopherol. UA is an important antioxidant, being responsible for 60% of the scavenging activity of the free radicals in human plasma. Additionally, a large body of evidence shows that there are major sex differences in the serum levels of UA. These levels are lower in women but the differences decrease with age particularly after menopause, indicating a possible hormonal influence [63]. This would explain why zNOx/TRAP ratio was higher in women.

We found that UA levels were significantly reduced by leflunomide which is known to be accompanied by lowered UA levels [27]. Perez-Ruiz & Nolla [64] reported that the decrease in serum urate levels during therapy with leflunomide occurred via increased renal excretion of UA. Leflunomide is a medication with large efficacy for the treatment of RA in adults [65]. The drug is an isoxazole derivative and its active metabolite, A77 1726, acts as an inhibitor of pyrimidine synthesis, reducing the proliferation of activated T lymphocytes [66] through the inhibition of the mitochondrial rate-limiting enzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH).

Several studies have associated leflunomide and decreases in biomarkers of oxidative stress [16,67]. Nevertheless, our data demonstrate adverse effects of leflunomide on prooxidant-antioxidant balance in patients with RA, as indicated by an increased zNOx/TRAP ratio and decreased TRAP and UA levels. Thus, the findings of reduced TRAP levels during leflunomide treatment are likely related to the decrease in serum urate levels that occurs following drug therapy. Although UA has been shown to have a protective antioxidant effect extracellularly [26] it is also a potent inducer of inflammation and intracellular oxidative stress [22–24]. In contrast, previous studies have demonstrated that levels of UA are not associated with changes in acute phase reactants, such as ESR and CRP [27,68]. Furthermore, serum UA levels did not correlate with clinical outcomes in RA such as CRP, swollen joint count or anti-cyclic citrullinated peptide antibody positivity [69]. Studies have also shown that elevated UA may be associated with cardiovascular risk and hypertension in patients with RA [69,70]. Considering that the use of leflunomide decreases the activity of the disease [71], we hypothesize that its effect in reducing UA levels is in a broad sense benefic, compensating the concomitant reduction in the antioxidant capacity.

The main limitation is that this is a cross-sectional study, thus does not allow inferences on causal relationships. A second limitation is that our study does not distinguish between active and inactive disease and, therefore, our findings may not be applicable to every phenotype. Strengths of our study are that we used multivariate statistical analyses thereby adjusting for many confounding variables including BMI, MetS and sex. A second strength is that the present data reinforce the need to measure oxidative stress with several methodologies with different assumptions.

In conclusion, our data demonstrated that NOx and NOx/TRAP are strongly associated with RA physiopathology. Our findings suggest that inhibition of iNOS may become an interesting therapeutic approach for the treatment of RA. In addition, the presence of MetS and decrease in levels of UA by leflunomide favor redox imbalance in RA patients. More studies are needed to evaluate the impact of antioxidant capacity reduction on RA progression.

#### **Compliance with ethical standards**

#### **Conflict of interest**

All authors have no actual or potential conflicts of interest.

### **Ethical approval**

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

### **REFERENCES**

- [1] Spector T. Rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:513–37.
- [2] Blanco LP, Ling S, Holoshitz J. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: New Insights. In: Dichi I, Breganó JW, Simão ANC, Cecchini R, editors. *Role Oxidative Stress Chronic Dis.*, vol. 1. 1st ed., Boca Raton, Florida: CRC Press; 2014, p. 481–500. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [3] Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2016;11:e0152925. doi:10.1371/journal.pone.0152925.
- [4] Schalkwijk J, van der Berg W, van de Putte L, Joosten L. An experimental model for hydrogen peroxide–induced tissue damage. Effects of a single inflammatory mediator on (peri)articular tissues. *Arthritis Rheum* 1986;29:532–8. doi:10.1002/art.1780290411.
- [5] Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:265–78. doi:10.1186/ar1447.
- [6] Halliwell B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 1995;54:505–10. doi:10.1136/ard.54.6.505.
- [7] Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003;5:R234–40. doi:10.1186/ar787.
- [8] Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42 Suppl 2:ii11–i16. doi:10.1093/rheumatology/keg327.

- [9] Nakajima A, Aoki Y, Shibata Y, Sonobe M, Terajima F, Takahashi H, et al. Identification of clinical parameters associated with serum oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2014;24:926–30. doi:10.3109/14397595.2014.891495.
- [10] Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A. Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2008;28:245–51. doi:10.1007/s00296-007-0419-1.
- [11] Cacciapaglia F, Grazia Anelli M, Rizzo D, Morelli E, Mazzotta D, Scioscia C, et al. Effective tumour necrosis factor-blocking therapy reduces reactive oxygen metabolite level in rheumatoid arthritis. *J Int Med Res* 2016;44:28–32. doi:10.1177/0300060515593227.
- [12] Kizaki K, Yamashita F, Hayashi T, Funakoshi N. Infliximab is equivalently suppressing oxidative stress compared to tocilizumab among well-controlled patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2016. doi:10.1111/1756-185X.12972.
- [13] Chimenti MS, Triggianese P, Conigliaro P, Candi E, Melino G, Perricone R. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis. *Cell Death Dis* 2015;6:e1887. doi:10.1038/cddis.2015.246.
- [14] da Cunha V, Brenol C V, Brenol JC, Fuchs SC, Arlindo EM, Melo IM, et al. Metabolic syndrome prevalence is increased in rheumatoid arthritis patients and is associated with disease activity. *Scand J Rheumatol* 2012;41:186–91. doi:10.3109/03009742.2011.626443.
- [15] Pierini D, Bryan NS. Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress. *Methods Mol Biol* 2015;1208:63–71. doi:10.1007/978-1-4939-1441-8\_5.
- [16] Reddy SVB, Wanchu A, Khullar M, Govindrajan S, Bambery P. Leflunomide reduces nitric oxide production in patients with active rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1085–90. doi:10.1016/j.intimp.2004.11.013.
- [17] Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23:230–6.
- [18] Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 1995;96:2357–63. doi:10.1172/JCI118292.

- [19] Moon S-J, Kim E-K, Jhun JY, Lee HJ, Lee WS, Park S-H, et al. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, attenuates inflammatory arthritis in mice with spontaneous arthritis via induction of heme oxygenase-1. *J Transl Med* 2017;15:31. doi:10.1186/s12967-017-1131-x.
- [20] Daoussis D, Kitis GD. Uric acid and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2011;50:1354–1355. doi:https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq388.
- [21] Daoussis D, Panoulas V, Toms T, John H, Antonopoulos I, Nightingale P, et al. Uric acid is a strong independent predictor of renal dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R116.
- [22] Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516–21. doi:10.1038/nature01991.
- [23] Kang D-H, Park S-K, Lee I-K, Johnson RJ. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3553–62. doi:10.1681/ASN.2005050572.
- [24] Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P, Nakagawa T, et al. Uric Acid Stimulates Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production in Vascular Smooth Muscle Cells via Mitogen-Activated Protein Kinase and Cyclooxygenase-2. *Hypertension* 2003;41:1287–93. doi:10.1161/01.HYP.0000072820.07472.3B.
- [25] Kang DH, Ha SK. Uric acid puzzle: Dual role as anti-oxidant and pro-oxidant. *Electrolyte Blood Press* 2014;12:1–6. doi:10.5049/EBP.2014.12.1.1.
- [26] Mazzali M, Kanbay M, Segal M, Shafiu M, Jalal D, Feig D, et al. Uric acid and hypertension: cause or effect? *Curr Rheumatol Rep* 2010;12:108–17.
- [27] Choe JY, Kim SK. Association between serum uric acid and inflammation in rheumatoid arthritis: Perspective on lowering serum uric acid of leflunomide. *Clin Chim Acta* 2015;438:29–34. doi:10.1016/j.cca.2014.07.039.
- [28] Lee JJ, Bykerk VP, Dresser GK, Boire G, Haraoui B, Hitchon C, et al. Reduction in serum uric acid may be related to methotrexate efficacy in early rheumatoid arthritis: Data from the Canadian Early Arthritis Cohort (CATCH). *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 2016;9:37–43. doi:10.4137/CMAMD.S38092.

- [29] Simão ANC, Lozovoy MAB, Dichi I. The uric acid metabolism pathway as a therapeutic target in hyperuricemia related to metabolic syndrome. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:1175–87. doi:10.1517/14728222.2012.723694.
- [30] Simão A, Dichi J, Barbosa D, Cecchini R, Dichi I. Influence of uric acid and gamma-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition* 2008;24:675–81. doi:10.1016/j.nut.2008.03.021.
- [31] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569–81. doi:10.1002/art.27584.
- [32] Grundy S, Brewer HJ, Cleeman J, Smith SJ, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arter Thromb Vasc Biol* 2004;24:e13–8.
- [33] Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991;10:93–100. doi:10.1016/0891-5849(91)90002-K.
- [34] Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357–63. doi:10.1016/S0076-6879(94)33041-7.
- [35] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304–13. doi:10.1038/ki.1996.186.
- [36] Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998;44:679–81. doi:10.1515/CCLM.2008.096.
- [37] Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996;255:107–17.
- [38] Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 2005;39:797–815. doi:10.1080/10715760500053651.
- [39] Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2010;12:210.

- doi:10.1186/ar3045.
- [40] Nagy G, Clark JM, Buzas E, Gorman C, Pasztoi M, Koncz A, et al. Nitric oxide production of T lymphocytes is increased in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 2008;118:55–8. doi:10.1016/j.imlet.2008.02.009.
- [41] Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1219–22.
- [42] Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2009;12:29–33. doi:10.1111/j.1756-185X.2009.01375.x.
- [43] van't Hof RJ, Hocking L, Wright PK, Ralston SH. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:1004–8.
- [44] Sokka T, Toloza S, Cutolo M, Kautiainen H, Makinen H, Gogus F, et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA Study. *Arthritis Res Ther* 2009;11.
- [45] Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. *Nutrition* 1997;13:65; discussion 64, 66. doi:S0899900797806375 [pii].
- [46] Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 2007;56:1010–3. doi:10.2337/db06-1656.
- [47] Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, Kahan A, Ekindjian O, Borderie D. Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clin Chim Acta* 2006;372:147–53. doi:10.1016/j.cca.2006.04.002.
- [48] Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JB de F, Benfato VM e M da S, Kubota LT. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quim Nov* 2007;30:1323–38.
- [49] Venturini D, Simão ANC, Dichi I. Advanced oxidation protein products are more related to metabolic syndrome components than biomarkers of lipid peroxidation. *Nutr Res* 2015;35:759–65. doi:10.1016/j.nutres.2015.06.013.
- [50] Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakucuk C, et al. Investigation of protein oxidation

- and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 2006;24:307–11. doi:10.1002/cbf.1257.
- [51] Leitemperguer M, Tatsch E, Kober H, Moresco R. Assessment of Ischemia-Modified Albumin Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clin Lab* 2014;60:1065–70. doi:10.7754/Clin.Lab.2013.130143.
- [52] Costa NT, Veiga Iriyoda TM, Kallaur AP, Delongui F, Alfieri DF, Lozovoy MAB, et al. Influence of Insulin Resistance and TNF on the Inflammatory Process, Oxidative Stress, and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:1–9. doi:10.1155/2016/8962763.
- [53] Lozovoy MAB, Simão ANC, Panis C, Rotter MAC, Reiche EM V, Morimoto HK, et al. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011;20:1250–9.
- [54] Oliveira SR, Kallaur AP, Reiche EM V, Kaimen-Maciel DR, Panis C, Lozovoy MAB, et al. Albumin and Protein Oxidation are Predictors that Differentiate Relapsing-Remitting from Progressive Clinical Forms of Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 2017;54:2961–8. doi:10.1007/s12035-016-9860-z.
- [55] Luczaj W, Gindzienska-Sieskiewicz E, Jarocka-Karpowicz I, Andrisic L, Sierakowski S, Zarkovic N, et al. The onset of lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: consequences and monitoring. *Free Radic Res* 2016;50:304–13. doi:10.3109/10715762.2015.1112901.
- [56] Isik A, Koca SS, Ustundag B, Celik H, Yildirim A. Paraoxonase and arylesterase levels in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007;26:342–8. doi:10.1007/s10067-006-0300-8.
- [57] Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2016;11:e0152925. doi:10.1371/journal.pone.0152925.
- [58] Jacobson GA, Ives SJ, Narkowicz C, Jones G. Plasma glutathione peroxidase (GSH-Px) concentration is elevated in rheumatoid arthritis: A case-control study. *Clin Rheumatol* 2012;31:1543–7. doi:10.1007/s10067-012-2046-9.
- [59] Kajanachumpol S, Vanichapuntu M, Verasertniyom O, Totemchokchyakarn K, Vatanasuk M. Levels of plasma lipid peroxide products and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31:335–8.
- [60] Gambhir JK, Lali P, Jain AK. Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in

- rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 1997;30:351–5.
- [61] El-barbary AM, Khalek MAA, Elsalawy AM, Hazaa SM. Assessment of lipid peroxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Egypt Rheumatol* 2011;33:179–85. doi:10.1016/j.ejr.2011.07.002.
- [62] Situnayake RD, Thurnham DI, Kootatthep S, Chirico S, Lunec J, Davis M, et al. Chain breaking antioxidant status in rheumatoid arthritis: clinical and laboratory correlates. *Ann Rheum Dis* 1991;50:81–6. doi:10.1136/ard.50.2.81.
- [63] Stöckl D, Döring A, Thorand B, Heier M, Belcredi P, Meisinger C. Reproductive Factors and Serum Uric Acid Levels in Females from the General Population: The KORA F4 Study. *PLoS One* 2012;7:e32668.
- [64] Perez-Ruiz F, Nolla J. Influence of leflunomide on renal handling of urate and phosphate in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2003;9:215–8. doi:10.1097/01.rhu.0000081470.31167.8b.
- [65] Alcorn N, Saunders S, Madhok R. Benefit-risk assessment of leflunomide: an appraisal of leflunomide in rheumatoid arthritis 10 years after licensing. *Drug Saf* 2009;32:1123–34. doi:10.2165/11316650-000000000-00000.
- [66] Osiri M, Shea B, Welch V, Suarez-Almazor ME, Strand V, Tugwell P, et al. Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2009. doi:10.1002/14651858.CD002047.
- [67] Elkayam O, Yaron I, Shirazi I, Judovitch R, Caspi D, Yaron M. Active leflunomide metabolite inhibits interleukin 1beta, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures. *Ann Rheum Dis* 2003;62:440–3. doi:10.1136/ard.62.5.440.
- [68] Arida D, Silva L, Skare T. The hypouricemic effect of leflunomide. *Jt Bone Spine* 2014;81:273–4. doi:10.1016/j.jbspin.2013.10.008.
- [69] Luczak A, Knevel R, Huizinga TWJ, van Nies JAB, van der Helm-van Mil A, De Vries-Bouwstra JK. No impact of serum uric acid on the outcome of recent-onset arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1424–5. doi:10.1136/annrheumdis-2011-201027.
- [70] Panoulas VF, Milionis HJ, Douglas KMJ, Nightingale P, Kita MD, Klocke R, et al. Association of serum uric acid with cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2007;46:1466–70.

doi:10.1093/rheumatology/kem159.

- [71] Kellner H, Bornholdt K, Hein G. Leflunomide in the treatment of patients with early rheumatoid arthritis-results of a prospective non-interventional study. *Clin Rheumatol* 2010;29:913–20.  
doi:10.1007/s10067-010-1425-3.

**Table 1. Socio-demographic, clinical and biomarkers data in healthy controls (HC) and patients with Rheumatoid Arthritis (RA)**

<b>Variables</b>	<b>HC</b>	<b>RA</b>	<b>F/x<sup>2</sup></b>	<b>df</b>	<b>p</b>
<b>Sex (female/male)</b>	108/42	144/33	4.02	1	0.045
<b>Age (years)</b>	45.1(8.7)	55.2(11.8)	76.27	1/324	<0.001
<b>Met S (Yes/No)</b>	33/111	57/115	4.02	1	0.045
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.2(4.2)	27.9(5.6)	9.08	1/316	0.003
<b>Caucasian/Not Caucasian</b>	119/31	110/63	9.96	1	0.002
<b>CPR (mg/dL)*</b>	2.67(3.49)	10.98(16.94)	63.00	1/317	<0.001
<b>AOPP (µmol/L of chloramine T equivalents)*</b>	150.7(58.5)	175.2(107.5)	3.17	1/322	0.076
<b>CL-LOOH (RLU) *</b>	196.0(207.1)	177.9(39.1)	1.98	1/277	0.161
<b>NOx (µM)*</b>	33.7(29.1)	73.7(44.6)	95.81	1/228	<0.001
<b>Carbonyl protein (ng/mL total protein)</b>	71.0(17.5)	81.6(31.1)	5.61	1/166	0.019
<b>TRAP (equivalent of µM Trolox)</b>	703.1(144.9)	634.5(166.8)	14.81	1/307	<0.001
<b>Uric Acid (mg/dL)</b>	4.42(1.43)	4.00(1.50)	6.26	1/318	0.013
<b>zAOPP+LOOH</b>	0.157(1.579)	0.274(1.286)	6.14	1/275	0.014
<b>zNOx/TRAP</b>	0.500(1.228)	1.369(1.153)	119.47	1/227	<0.001

All data are shown as mean ( $\pm$ SD). F: all results of analyses of variance. x<sup>2</sup>: results of contingency analysis .

\*These data were processed in Ln transformation. Met S: Metabolic Syndrome; BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein ; AOPP: advanced oxidation protein products; LOOH: Hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; NOx: nitric oxide metabolites; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; zAOPP+LOOH: computed as z score of AOPP + z score of LOOH, index of oxidative damage; zNOx/TRAP: computed as z score of zNOx – z score of TRAP, index of increased NO production

**Table 2. Results of multivariate General Linear Model (GLM) analysis with the oxidative and nitrosative stress biomarkers as dependent variables and drug, metabolic syndrome (MetS), age, sex and body mass index (BMI) as explanatory variables.**

Tests	Dependent variables	Explanatory variables	F	df	p	Partial Eta square	
<b>Multivariate #1</b>	AOPP, LOOH, NO <sub>x</sub> , carbonyl esters, TRAP, UA, zAOPP+LOOH, zNO <sub>x</sub> /TRAP	MetS	5.56	6/60	<0.001	0.357	
		leflunomide	5.15	6/60	<0.001	0.340	
		Antimalarials	1.23	6/60	0.302	0.110	
		Prednisone	1.76	6/60	0.122	0.150	
		Anti-TNF	0.69	6/60	0.655	0.065	
		Methotrexate	0.65	6/60	0.692	0.061	
<b>Between-subject effects</b>	NO <sub>x</sub> TRAP UA zNO <sub>x</sub> /TRAP	leflunomide	9.03	1/65	0.004	0.122	
		leflunomide	4.06	1/65	0.048	0.059	
		leflunomide	17.43	1/65	<0.001	0.211	
		leflunomide	14.68	1/65	<0.001	0.184	
<b>Multivariate #2</b>	AOPP, LOOH, NO <sub>x</sub> , carbonyl esters, TRAP, UA, zAOPP+LOOH, zNO <sub>x</sub> /TRAP	RA± leflunomide	10.29	12/264	<0.001	0.319	
		MetS	4.19	6/132	0.001	0.160	
		Sex	1.95	6/132	0.078	0.081	
		BMI	2.49	6/132	0.026	0.102	
		Age	1.62	6/132	0.147	0.069	
		<b>Between-subject effects</b>	AOPP	MetS	34.50	1/304	<0.001
RA± leflunomide	42.76			1/213	<0.001	0.286	
Sex	11.75			2/213	0.001	0.052	
Carbonyl esters	RA± leflunomide		3.37	2/153	0.037	0.042	
	TRAP		RA± leflunomide	17.33	2/289	<0.001	0.107
			BMI	4.36	1/289	0.038	0.015
Sex			18.45	1/289	<0.001	0.060	
UA	RA± leflunomide		20.64	2/302	<0.001	0.120	
	MetS		9.14	1/302	0.003	0.029	
	BMI		21.96	1/302	<0.001	0.068	
	sex		37.52	1/302	<0.001	0.111	
	zAOPP+LOOH		MetS	29.31	1/262	<0.001	0.101
			zNO <sub>x</sub> /TRAP	RA± leflunomide	73.20	1/212	<0.001
sex				22.32	1/212	<0.001	0.095

Met S: Metabolic Syndrome; BMI: body mass index; RA± leflunomide: rheumatoid arthritis patients using or not using leflunomide; AOPP: advanced oxidation protein products; LOOH: Hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; Nox: nitric oxide metabolites; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; UA: uric acid; zAOPP+LOOH: computed as z score of AOPP + z score of LOOH; zNO<sub>x</sub>/TRAP: computed as z score of zNO<sub>x</sub> – z score of TRAP

Table 3. Estimated marginal means (SE) of the oxidative and nitrosative biomarkers obtained by multivariate General Linear Model (GLM) analysis, table 2. All data are expressed as z-scores

<b>Variables</b>	<b>normal controls<sup>A</sup></b>	<b>RA – leflunomide<sup>B</sup></b>	<b>RA + leflunomide<sup>C</sup></b>
<b>NOx</b>	-0.501(0.080) <sup>B,C</sup>	+0.462(0.132) <sup>A</sup>	+0.718(0.147) <sup>A</sup>
<b>Carbonyl esters</b>	-0.251(0.136) <sup>C</sup>	-0.103(0.172)	+0.274(0.191) <sup>A</sup>
<b>TRAP</b>	+0.401(0.086) <sup>C</sup>	+0.271(0.108) <sup>C</sup>	-0.361(0.119) <sup>A,B</sup>
<b>UA</b>	+0.482(0.077) <sup>C</sup>	+0.383(0.091) <sup>C</sup>	-0.260(0.105) <sup>A,B</sup>
<b>zNOx/TRAP</b>	-0.833(0.109) <sup>B,C</sup>	+0.521(0.182) <sup>A,C</sup>	+1.570(0.201) <sup>A,B</sup>
<b>Variables</b>	<b>No MetS</b>	<b>MetS +</b>	
<b>AOPP</b>	-0.223(0.079)	+0.512(0.105)	
<b>UA</b>	+0.035(0.070)	+0.369(0.093)	
<b>zAOPP+LOOH</b>	-0.214(0.123)	+0.817(0.169)	
<b>Variables</b>	<b>female</b>	<b>Male</b>	
<b>Nox</b>	+0.461(0.079)	-0.008(0.125)	
<b>TRAP</b>	-0.176(0.069)	+0.389(0.116)	
<b>UA</b>	-0.149(0.060)	+0.553(0.102)	
<b>zNOx/TRAP</b>	+0.861(0.108)	-0.022(0.172)	

NOx: nitric oxide metabolites; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; UA: uric acid; AOPP: advanced oxidation protein products; LOOH: Hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; zAOPP+LOOH: computed as z score of AOPP + z score of LOOH; zNOx/TRAP: computed as z score of zNOx – z score of TRAP. <sup>A,B,C</sup> demonstrate statistical differences between groups p<0.05

Table 4. Results of two different logistic regression analysis with Rheumatoid Arthritis as dependent variable.

	<b>Explanatory variables</b>	<b>Wald</b>	<b>df</b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>
<b>Regression #1</b>	Res zNOx/TRAP	20.04	1	<0.001	2.34	1.61-3.40
	Res zAOPP+LOOH	6.12	1	0.013	0.68	0.50-0.92
	Age	37.72	1	<0.001	1.15	1.10-1.20
	BMI	8.03	1	0.005	1.12	1.04-1.22
<b>Regression#2</b>	zNOx/TRAP	19.20	1	<0.001	2.30	1.57-3.37
	Res CRP	10.35	1	0.001	2.32	1.39-3.87
	Age	5.86	1	0.015	1.15	1.09-1.20
	BMI	32.44	1	<0.001	1.10	1.10-1.20

NOx: nitric oxide metabolites; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; AOPP: advanced oxidation protein products; LOOH: Hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein

Res zNOx/TRAP: residualized values of zNOx/TRAP (z-score of NOx – z score of TRAP) obtained by regression on use of nucleotide inhibitors and gender

Res zAOPP+LOOH: residualized values of zAOPP+LOOH (z-score of AOPP + z score of LOOH) obtained by regression on metabolic syndrome

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 CONCLUSÃO DO ARTIGO 1:

Os resultados da maioria dos estudos incluídos na revisão da literatura mostraram uma melhora no estado redox, seja pela diminuição nos marcadores de oxidação ou pelo incremento na capacidade antioxidante ou ambos. Esta melhora no estado redox pode estar relacionada com o sucesso da terapêutica. Os estudos com MTX e leflunomida apresentaram resultados semelhantes, com redução do NO. Os estudos com tocilizumabe verificaram acentuada diminuição de ERO e ERN. Na maioria dos estudos que utilizaram o infliximabe, houve diminuição da oxidação proteica, avaliada por meio de PC. O único estudo com etanercepte mostrou resultados muito semelhantes aos obtidos com estudo com MTX, com diminuição da pentosidina e do dano oxidativo ao DNA. Os resultados mais marcantes se verificaram no aumento das defesas antioxidantes mostrados através de vários marcadores individuais e sistemas antioxidantes.

### 6.2 CONCLUSÃO DO ARTIGO 2:

Nossos dados demonstram que o metabolismo do NO, e não o dano oxidativo de proteínas ou de lipídios, está fortemente associado à fisiopatologia da AR. Portanto, o metabolismo do NO e a óxido nítrico sintetase induzível podem se tornar novos alvos terapêuticos na AR. Além disso, a presença de SM e a diminuição dos níveis de AU pela leflunomida parecem favorecer o desequilíbrio redox em pacientes com AR. São necessários mais estudos para avaliar o impacto da redução da capacidade antioxidante na progressão da AR.

### 6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de nosso estudo nos permitem concluir que a SM na AR está associada à uma piora do estado redox, promovendo aumento na oxidação proteica e lipídica, aumento nos níveis de NOx e AU. A AR não se associa ao aumento da oxidação proteica nem lipídica em comparação aos indivíduos controles, mas sim a SM. Além disso, podemos concluir que o uso de leflunomida associou-se à diminuição de TRAP, provavelmente pela diminuição do AU provocada por esse fármaco.

As pacientes do sexo feminino apresentaram maiores níveis de NOx e menores níveis de TRAP do que os homens. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a descrever o dimorfismo sexual nos marcadores de estresse oxidativo.

Os resultados deste trabalho nos permitem propor um modelo que está fortemente associado à AR, no qual a razão zNOx / TRAP, PCR, idade e IMC classificaram corretamente os pacientes com AR com alta sensibilidade e especificidade.

Assim, a mensuração do estresse oxidativo e nitrosativo parece ter um papel importante como marcador de progressão da doença e resposta ao tratamento com MMCD em pacientes com artrite reumatoide.

## REFERÊNCIAS

ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, 1 set. 2010.

ALTINDAG, O. et al. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 167–171, mar. 2007.

AVIÑA-ZUBIETA, J. A. et al. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. **Arthritis & Rheumatism**, v. 59, n. 12, p. 1690–1697, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BECKER, M. **Urate balance**. Disponível em: <[www.uptodate.com/home](http://www.uptodate.com/home)>. Acesso em: 26 set. 2017.

BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 17–19, 2016.

BURMESTER, G. R.; POPE, J. E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 389, n. 10086, p. 2338–2348, jun. 2017.

CARVALHO, M. A. P.; LANNA, C. C. D.; BÉRTOLO, M. B. **Reumatologia : Diagnóstico e Tratamento**. 4º ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

CATRINA, A. I. et al. Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 269, n. 1, p. 162–174, jan. 2016.

CHOE, J.-Y.; KIM, S.-K. Association between serum uric acid and inflammation in rheumatoid arthritis: Perspective on lowering serum uric acid of leflunomide. **Clinica Chimica Acta**, v. 438, p. 29–34, jan. 2015.

CHUNG, C. P. et al. Prevalence of the metabolic syndrome is increased in rheumatoid arthritis and is associated with coronary atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 2, p. 756–763, fev. 2008.

CLANCY, J.; HASTHORPE, H. Pathophysiology of rheumatoid arthritis: nature or nurture? **Primary Health Care**, v. 21, n. 9, p. 29–36, nov. 2011.

COIMBRA, I. B. et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 4, p. 336–45, abr. 2004.

COUTO, D. et al. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species by the prodrug sulfasalazine and its metabolites 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine. **Redox Report**, v. 15, n. 6, p. 259–267, 19 dez. 2010.

DA CUNHA, V. R. et al. Metabolic syndrome prevalence is increased in rheumatoid arthritis patients and is associated with disease activity. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 41, n. 3, p. 186–191, 15 maio 2012.

DAOUSSIS, D.; KITAS, G. D. Uric acid and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 50, n. 8, p. 1354–1355, 1 ago. 2011.

DESAI, P. B. et al. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 11, p. 959–67, nov. 2010.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9468, p. 1415–28, abr. 2005.

FEIG, D. I.; KANG, D.-H.; JOHNSON, R. J. Uric Acid and Cardiovascular Risk. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 17, p. 1811–1821, 23 out. 2008.

FORD, E. S. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1769–78, jul. 2005.

FOX, R. I. et al. Mechanism of Action for Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. **Clinical Immunology**, v. 93, n. 3, p. 198–208, dez. 1999.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991.

GRINGHUIS, S. I. et al. Displacement of Linker for Activation of T Cells from the Plasma Membrane Due to Redox Balance Alterations Results in Hyporesponsiveness of Synovial Fluid T Lymphocytes in Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 2170–2179, fev. 2000.

GRUNDY, S. et al. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, n. 25, p. 3143–421, 2002.

HAIJZADEH, S. et al. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 5, n. 5, p. R234-40, 2003.

HALLAJZADEH, J. et al. Metabolic syndrome and its components among rheumatoid arthritis patients: A comprehensive updated systematic review and meta-analysis. **PloS One**, v. 12, n. 3, p. e0170361, 23 mar. 2017.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation : its mechanism , measurement and significance. **Am J Clin Nutr**, v. 57, n. suppl, p. 715S–25S, 1993.

HANLEY, A. J. G. et al. Prediction of type 2 diabetes mellitus with alternative definitions of the metabolic syndrome: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Circulation**, v. 112, n. 24, p. 3713–3721, 2005.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6, n. 6, p. 265–78, 2004.

HOCHBERG, M. et al. **Rheumatology**. Sixth ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2015.

JEON, C. H. et al. Hypoxia appears at pre-arthritic stage and shows co-localization with early synovial inflammation in collagen induced arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 26, n. 4, p. 646–648, 2008.

JOHNSON, R. J. et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1183–1190, 2003.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1865–79, 2006.

KAGEYAMA, Y. et al. Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF-alpha antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 73–80, 2008a.

KAGEYAMA, Y. et al. Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 28, n. 3, p. 245–251, 28 jan. 2008b.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244–57, 8 fev. 2013.

KANELIS, J. et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1287–1293, 2003.

LEE, J. J. et al. Reduction in Serum Uric Acid May Be Related to Methotrexate Efficacy in Early Rheumatoid Arthritis: Data from the Canadian Early Arthritis Cohort (CATCH). **Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord**, v. 9, p. 37–43, 2016.

LYNGDOH, T. et al. Elevated serum uric acid is associated with high circulating inflammatory cytokines in the population-based Colaus study. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19901, 2011.

MARROCCO, I.; ALTIERI, F.; PELUSO, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 6501046, 2017.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 389, n. 10086, p. 2328–2337, 2017.

MIESEL, R.; MURPHY, M. P.; KRÖGER, H. Enhanced Mitochondrial Radical Production in Patients with Rheumatoid Arthritis Correlates with Elevated Levels of Tumor Necrosis Factor alpha in Plasma. **Free Radical Research**, v. 25, n. 2, p. 161–169, 7 jan. 1996.

MOTA, L. M. H. et al. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatoide Guidelines for the drug treatment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 2, p. 158–183, 2013.

MYASOEDOVA, E. et al. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising? Results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 6, p. 1576–1582, 2010.

NAKAJIMA, A. et al. Identification of clinical parameters associated with serum oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. **Modern Rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 926–30, 26 nov. 2014.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679–81, mar. 1998.

OZKAN, Y. et al. Oxidative status in rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 64–68, jan. 2007.

PEREIRA, I. A. et al. Reumatologia sobre o manejo de comorbidades em pacientes com artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 4, 2012.

PEREZ-RUIZ, F.; NOLLA, J. M. J. Influence of Leflunomide on Renal Handling of Urate and Phosphate in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 9, n. 4, p. 215–218, ago. 2003.

PREVOO, M. et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight - joint counts. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 1, p. 44–48, 1995.

PUFE, T. et al. Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p. 185–92, jan. 2004.

QUIÑONEZ-FLORES, C. M. et al. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 6097417, 2016.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107–117, 1996.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.]. v. 233p. 357–363.

RICHETTE, P.; BARDIN, T. Gout. **The Lancet**, v. 375, n. 9711, p. 318–328, 2010.

RUGGIERO, C. et al. Uric acid and inflammatory markers. **Eur Heart J.**, v. 27, n. 10, p. 1174–1181, 2009.

RUTTER, M. K. et al. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham offspring study. **Circulation**, v. 110, n. 4, p. 380–385, 2004.

SANTOS, CELIO X; TANAKA LY, WOSNIAK J, L. F. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 10, p. 2409–2427, 2009.

SCHALKWIJK, J. et al. An experimental model for hydrogen peroxide–induced tissue damage. Effects of a single inflammatory mediator on (peri)articular tissues. **Arthritis & Rheumatism**, v. 29, n. 4, p. 532–538, 1986.

SHAHMOHAMADNEJAD, S. et al. Association between butyrylcholinesterase activity and phenotypes, paraoxonase192 rs662 gene polymorphism and their enzymatic activity with severity of rheumatoid arthritis: correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress, preliminary. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 1–2, p. 63–9, jan. 2015.

SIMÃO, A. N. C. et al. Influence of uric acid and gamma-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 24, n. 7–8, p. 675–681, jul. 2008.

SIMÃO, A. N. C.; LOZOVYOY, M. A. B.; DICHI, I. The uric acid metabolism pathway as a therapeutic target in hyperuricemia related to metabolic syndrome. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. 12, p. 1175–1187, 28 dez. 2012.

SINGH, J. A. et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 68, n. 1, p. 1–26, 2016.

SKEOCH, S.; BRUCE, I. N. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 7, p. 390–400, 2015.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 6, p. 960–977, 2017.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet (London, England)**, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 22 out. 2016.

SPURLOCK III, C. et al. Increased sensitivity to apoptosis induced by methotrexate is mediated by Jun N-terminal kinase. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 9, p. 2606–2616, 2011.

TURESSON, C.; O'FALLON, W.; CROWSON, C. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. **Ann Rheum Dis**, v. 62, p. 722–727, 2003.

WEINBLATT, M. E. et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 1, p. 35–45, jan. 2003.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 5, p. 2524–32, set. 1998.

YOKOZAWA, T. et al. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 5068–5073, 2000.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa:

**“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES E FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE”**

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participara da pesquisa **“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES E FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE”**, realizada no Hospital Universitário de Londrina (HU) da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é identificar os fatores de risco cardiovasculares em pacientes com artrite reumatóide (AR). A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: avaliação clínica pelo médico reumatologista e coleta de sangue. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é voluntária, podendo você: recusar-se a participar ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. **Serão realizados testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico e prognóstico de artrite reumatóide, determinação da atividade da doença, perfil metabólico, resposta imunológica, estresse oxidativo e outras análises que se façam necessárias.**

Os benefícios esperados são: 1) o conhecimento da prevalência de síndrome metabólica em pacientes com AR, de uma amostra da população brasileira, permite a estratificação de risco cardiovascular, o que implica em manejo mais adequado de acordo com as características da nossa população; 2) o entendimento da fisiopatologia que envolve as alterações do estresse oxidativo e inflamação na AR possibilita melhor monitoramento da doença e desenvolvimento de novas intervenções medicamentosas.

Informamos que o (a) senhor (a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar (médicas reumatologistas Neide Tomimura Costa – telefone 9921-9849 ou Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda telefone 9627-8181) ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, 60 ou no telefone 3371-2490 . Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

\_\_\_\_\_( nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura ( ou impressão dactiloscópica) : \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_( nome do membro da equipe que apresentou o TCLE), obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito da pesquisa para a sua participação na mesma.

\_\_\_\_\_  
( assinatura do membro da equipe que apresentou o TCLE)

Pesquisadores responsáveis

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra Andréa Name Colado Simão

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Isaias Dichi

**APÊNDICE B - FICHA DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

NOME: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ telefone: \_\_\_\_\_ data : \_\_\_\_\_

IDADE OU Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Sexo : ( ) feminino ( ) masculino

Etnia: ( ) caucasiano ( ) não caucasiano

TEMPO DE DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_

DAS 28: VHS \_\_\_\_\_ PCR \_\_\_\_\_

Comprometimento sistêmico extra-articular:

Pulmonar ( ) vasculite ( ) nódulos reumatóides ( ) cardíaco ( ) SNC  
( )

Outras doenças:

HAS ( ) DM ( ) dislipidemia ( ) IAM ( ) AVC ( ) tireóide ( ) ,

outros: \_\_\_\_\_ outra colagenose: \_\_\_\_\_

**MEDICAÇÕES**

( ) Prednisona dose : \_\_\_\_\_

( ) Metotrexato dose : \_\_\_\_\_

( ) Hidroxicloroquina ou cloroquina dose : \_\_\_\_\_

( ) Sulfassalazina dose : \_\_\_\_\_

( ) Leflunomida dose : \_\_\_\_\_

( ) Etanercepte dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Adalimumabe dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Infliximabe dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Tocilizumabe dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Abatacepte dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Rituximabe dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Ciclofosfamida : \_\_\_\_\_

( ) outros : \_\_\_\_\_

Tabagismo : ( ) sim ( ) não

Atividade física sim ( ) não ( )

Tipo: \_\_\_\_\_ frequência : \_\_\_\_\_ há quanto tempo:

\_\_\_\_\_

#### Dados antropométricos

Altura ( cm )	Peso ( kg)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Circunferência abdominal ( cm)	Pressão arterial ( mmHg)

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES E FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE.

**Pesquisador:** Andréa Name Colado Simão

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 06405812.1.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 205.175

**Data da Relatoria:** 04/02/2013

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto relevante do ponto de vista científico pois visa avaliar os fatores de risco de doença cardiovascular em pacientes com artrite reumatóide e a doença cardiovascular representa causa importante de mortalidade nestes pacientes. Da mesma forma, o conhecimento da frequência de síndrome metabólica e do estresse oxidativo nestes pacientes, poderão trazer subsídios importantes para o cuidado dos mesmos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o estresse oxidativo, os fatores de risco cardiovascular, prevalência de resistência insulínica e síndrome metabólica em pacientes com Artrite Reumatóide. Este estudo também propõem-se a avaliar se a presença de SM e/ou RI aumentam o estresse oxidativo em pacientes com artrite reumatóide.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Não há riscos aparentes para os pacientes uma vez que estes passarão por consulta especializada e coleta de sangue para exames que são rotina no seu atendimento. Idem para os controles que são doadores voluntários de sangue;
- não há benefício ou vantagem imediata inadequada para os participantes da pesquisa. Os resultados da pesquisa poderão trazer como benefícios, conhecimentos importantes para o tratamento de pacientes com artrite reumatóide.

**Endereço:** AVENIDA ROBERT KOCH, 60

**Bairro:** VILA OPERÁRIA

**UF:** PR

**Telefone:** (43)3371-2490

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.038-440

**E-mail:** cep268@uel.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto relevante do ponto de vista da ética em pesquisa e que teve as pendências levantadas na primeira análise pelo CEP resolvidas.

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

- 1) Folha de rosto: adequada, assinada por uma das docentes participantes da pesquisa e por sua chefe de departamento;
- 2) Há o termo de concordância da Instituição Co-Participante (HU/UEL): adequado;
- 3) TCLE: adequado para os pacientes e controles;
- 4) Cronograma: inadequado pois prevê a coleta de dados a partir de Novembro de 2012 mas foi colocada a ressalva de que a coleta de dados será iniciada apenas após a aprovação pelo CEP.

**Recomendações:**

- não há.

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

- Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto passa a ser considerado aprovado após a regularização das pendências apontadas em análise prévia por este relator e pela plenária do CEP.

LONDRINA, 25 de Fevereiro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Paula Mariza Zedu Alliprandini**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** AVENIDA ROBERT KOCH, 60

**Bairro:** VILA OPERÁRIA

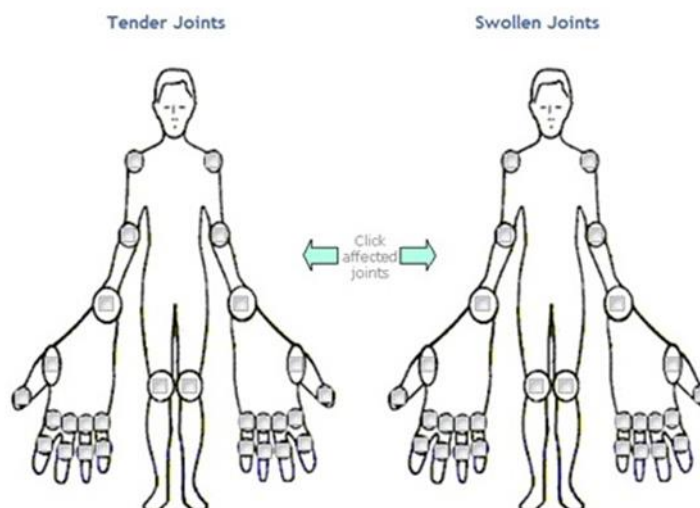
**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-2490

**CEP:** 86.038-440

**E-mail:** cep268@uel.br

**ANEXO B – AVALIAÇÃO DO DISEASE ACTIVITY SCORE 28 JOINTS**

$$\text{DAS28} = 0,56 \times \sqrt{\text{NAD28}} + 0,28 \times \sqrt{\text{NAE28}} + 0,70 \times \text{Ln VHS} + 0,014 \times \text{AGS}$$

NAD28 : número de articulações dolorosas dentre 28 articulações  
NAE28 é o número de articulações edemaciadas dentre 28 articulações  
Ln : logaritmo  
AGS : avaliação global de saúde.

Pode ser facilmente calculado com auxílio de calculadoras disponíveis na internet ([www.das-score.nl](http://www.das-score.nl)) ou por aplicativos de celular (DAS28 ACR-EULAR, disponível na APP store)

**ANEXO C – AVALIAÇÃO DA SAÚDE GLOBAL PELO PACIENTE****AVALIAÇÃO DA SAÚDE GLOBAL**

Marque a opção em que você se encontra em relação à artrite reumatoide (dor, capacidade funcional) considerando os últimos 7 dias:

