



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELO CÂNDIDO DE SÁ

**PERFIL DE MOLÉCULAS DE ADESÃO E NÍVEIS DO
INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO (PAI-1) EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE:
INFLUÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA**

Londrina
2017

MARCELO CÂNDIDO DE SÁ

**PERFIL DE MOLÉCULAS DE ADESÃO E NÍVEIS DO
INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO (PAI-1) EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE:
INFLUÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Isaias Dichi.

Londrina
2017

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S111p Sá, Marcelo Cândido de.

Perfil de moléculas de adesão e níveis do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) em pacientes com artrite reumatóide : influência da síndrome metabólica / Marcelo Cândido de Sá. – Londrina, 2017.
77 f. il.

Orientador: Isaías Dichi.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Artrite reumatóide – Teses. 2. Síndrome metabólica – Teses. 3. Moléculas de adesão celular – Teses. 4. Fator de necrose de tumor – Teses. 5. Fisiopatologia – Teses. I. Dichi, Isaías. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 616.72

MARCELO CÂNDIDO DE SÁ

**PERFIL DE MOLÉCULAS DE ADESÃO E NÍVEIS DO INIBIDOR DO
ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO (PAI-1) EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE:
INFLUÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção de título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dra. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de novembro de 2017.

MARCELO CÂNDIDO DE SÁ

**PERFIL DE MOLÉCULAS DE ADESÃO E NÍVEIS DO INIBIDOR DO
ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO (PAI-1) EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE:
INFLUÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito à obtenção de título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA
(Suplentes)

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

Prof. Dr. José Wander Breganó
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de novembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha esposa Nicolle, que esteve sempre ao meu lado, pelo amor, total apoio e incentivo durante todo esse tempo. A minha filha Alice, por toda sua graciosidade e carinho.

À minha família pelo apoio incondicional e incentivo. Em especial a minha mãe Arlete, minha irmã, minhas tias e meus sogros.

Ao meu orientador Prof. Dr. Isaías Dichi e co-orientador Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy por terem me confiado essa oportunidade única, pela preciosa orientação prestada e todo conhecimento transmitido durante a elaboração desse trabalho.

À Profa. Dra Andrea Name Colado Simão e a Prof. Dra Edna Maria Vissoci Reiche, por toda contribuição essencial para conclusão desse trabalho e pela disposição que sempre demonstraram.

Ao Dr. Michael Maes, pela colaboração essencial na elaboração da análise estatística.

À Profa. Dra. Sayonara Rangel de Oliveira e a Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski pela valiosa participação na banca examinadora e contribuição para realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Imunologia que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos pacientes que participaram deste estudo pela disposição e colaboração.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Aos meu amigos, Fabiano Aparecido de Medeiros, Daniela Frizon Alfieri, Tamires Flauzino, Tatiana Veiga Mayumi Iriyoda, Neide Tomimura Costa e Bruno Alexandre Sekiguchi pela fundamental contribuição neste trabalho.

Por fim, à todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SÁ, Marcelo Cândido de. **Perfil de moléculas de adesão em pacientes com artrite reumatoide: papel da síndrome metabólica.** 2017. 77 f. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

RESUMO

Introdução: a artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória crônica que apresenta característica ativação endotelial e um aumento no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A prevalência da síndrome metabólica (SM) tem sido relatada como aumentada em pacientes com AR. A SM é um conjunto de alterações fisiológicas, bioquímicas e metabólicas interconectadas, também relacionadas a um aumento no risco de doenças cardiovasculares. **Objetivos:** Verificar os níveis de moléculas de adesão e do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) em pacientes com AR, com e sem a presença da SM e propor modelos preditores para o diagnóstico da AR e para a atividade da doença. **Métodos:** 115 indivíduos controles e 144 pacientes com AR foram selecionados. A atividade da doença foi determinada pelo DAS28 (Disease Activity score 28) baseado na velocidade de hemossedimentação (DAS28-VHS) e proteína C reativa (DAS28-PCR). Foram determinados o índice de massa corpórea (IMC), a circunferência abdominal e pressão arterial dos indivíduos. Foram realizadas as seguintes análises laboratoriais: níveis do autoanticorpo anti-CCP, fator reumatoide, proteína C reativa (PCR), glicose, HDL-colesterol, triacilgliceróis, moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1), moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), moléculas de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (PECAM-1), E-selectina, P-selectina, assim como o PAI-1 e TNF- α . A presença da SM foi definida pelos critérios propostos pela “*American Heart Association*”. **Resultados:** os níveis de VCAM-1 foram significativamente menores e os níveis de PAI-1 foram significativamente maiores em pacientes com AR em comparação ao grupo controle. A análise de regressão logística binária demonstrou que a análise conjunta da VCAM-1, proteína C reativa (PCR), TNF- α e da idade puderam classificar corretamente a presença de AR com uma sensibilidade de 95,9 % e uma especificidade de 89,5%. Foram realizadas análises de regressão com o DAS28-VHS e o DAS28-PCR como variáveis dependentes, nas quais se verificou que 42,9 % da variação no DAS28-VHS e 49,2% da variação no DAS-28-PCR foi explicada pelo aumento no PAI-1, TNF- α , IMC, idade e redução nos níveis de PECAM-1. Já a SM foi caracterizada por níveis elevados de PAI-1, E-selectina e P-selectina. Os níveis elevados de selectinas sugerem que a SM interfere na primeira etapa da cascata de adesão leucocitária. A associação encontrada entre o IMC e o DAS28 indica uma possível influência da SM na atividade da AR. **Conclusão:** nossos dados demonstraram que níveis reduzidos de VCAM-1 e níveis elevados de PAI-1 estão associados a AR independentemente da presença da SM, embora a SM possa elevar ainda mais os níveis de PAI-1. A SM foi associada à níveis elevados de PAI-1, E-selectina e P-selectina. Foi proposto um modelo preditor do diagnóstico de AR baseado nos níveis de VCAM-1, TNF- α , PCR e idade, e um modelo preditor do DAS28-PCR e do DAS28-VHS baseado nos níveis de PECAM-1, PAI-1, TNF- α , idade e IMC. Dessa forma, os níveis de PAI-1, VCAM-1 e PECAM-1 tem um papel na fisiopatologia da AR, enquanto PAI-1, E-selectina e P-selectina tem um papel na fisiopatologia da SM. Esses resultados reforçam a importância do diagnóstico e tratamento da SM em pacientes com AR, haja vista a influência que a SM pode exercer sobre a atividade da doença.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide. Moléculas de adesão celular. Inibidor do ativador do plasminogênio. Síndrome metabólica. Fator de necrose tumoral- α .

SÁ, Marcelo Cândido de. **Cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor type-1 (pai-1) in patients with rheumatoid arthritis and metabolic syndrome.** 2017. 77 f. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory systemic disease characterized by endothelial activation that leads to an increased risk of cardiovascular disease. The prevalence of metabolic syndrome (MetS) has been reported as increased in patients with RA. MetS is a set of interconnected physiological, biochemical, and metabolic changes related to an increased prevalence of diabetes mellitus type II and cardiovascular disease risk. **Objectives:** to verify the levels of adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in RA patients with and without the presence of MetS and to propose prediction models for the diagnosis and disease activity in RA. **Methods:** 115 healthy subjects and 144 RA patients were enrolled. Disease activity was determined by DAS28 (Disease Activity score 28) based on erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR) and C-reactive protein (DAS28-CRP). Body mass index (BMI) and abdominal circumference were determined. The following blood analyses were performed: Anti-CCP autoantibody, rheumatoid factor levels, glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, triacylglycerols levels, the vascular cell adhesion molecules-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecules-1 (ICAM-1), platelet-endothelial cell adhesion molecules-1 (PECAM-1), E-selectin, P-selectin, as well as PAI-1 and TNF- α . The diagnosis of metabolic syndrome (MS) was defined by the criteria proposed by the American Heart Association. **Results:** VCAM-1 levels were significantly lower and PAI-1 levels were significantly higher in RA patients compared to the control group. Binary logistic regression analysis showed that the combined analysis of VCAM-1, C-reactive protein (CRP), TNF- α and age could correctly classify the presence of RA with a sensitivity of 95.9% and a specificity of 89.5%. Regression analysis was performed with DAS28-ESR and DAS28-CRP as dependent variables, in which it was verified that 42.9% of the variation in DAS28-ESR and 49.2% of the variation in DAS-28-CRP could be explained by the increase in PAI-1, TNF- α , BMI, age and reduction in levels of PECAM-1. SM was characterized by elevated levels of PAI-1, E-selectin and P-selectin. Elevated levels of selectins indicate that SM interferes at the first stage of the leukocyte adhesion cascade. The association found between BMI and DAS28 indicates the possible influence of the MetS on RA activity. **Conclusion:** Our data demonstrated that reduced levels of VCAM-1 and elevated levels of PAI-1 are associated with RA independently of the presence of MetS, although MetS can further raise PAI-1 levels. MetS was associated with elevated levels of PAI-1, E-selectin and P-selectin. A predictive model for the diagnosis of RA based on the levels of VCAM-1, TNF- α , CRP and age and a predictive model of DAS28-CRP and DAS28-ESR based on PECAM-1, PAI-1, TNF- α , age and BMI was proposed. Thus, levels of PAI-1, VCAM-1 and PECAM-1 play a role in the pathophysiology of RA, while PAI-1, E-selectin and P-selectin play a role in the pathophysiology of MetS. These results reinforce the importance of the diagnosis and treatment of the MetS in RA patients, since it can influence the activity of the disease.

Key words: Rheumatoid arthritis. Cell adhesion molecules. Plasminogen activator inhibitor. Metabolic syndrome. Tumor necrosis factor- α .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-CCP	Autoanticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico
AR	Artrite Reumatoide
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
DAS	Índice de atividade da doença
DCV	Doenças cardiovasculares
DM2	Diabete Mellitus tipo 2
EC	Epítipo compartilhado
EULAR	Liga Europeia de reumatismo
FR	Fator Reumatóide
ICAM-1	Molécula de adesão celular intercelular 1
IL	Interleucina
IgG	Imunoglobulina G
IgSF	Superfamília das Imunoglobulinas
IMC	Índice de massa corporal
LB	Linfócito B
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	Molécula associada a função leucocitária tipo 1
LT	Linfócito T
MAC	Molécula de Adesão Celular
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NCEP	Programa Nacional de Educação para o Colesterol dos Estados Unidos
NFκ-B	Fator de Nuclear κ-B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogênio
PCR	Proteína C Reativa
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1
SM	Síndrome Metabólica
TNF-α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual
uPA	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	
1.1	Artrite Reumatoide.....	11
1.2	Síndrome Metabólica.....	14
1.3	Fator de Necrose Tumoral- α	16
1.4	Moléculas de Adesão Celular (MAC).....	18
1.4.1	Definição.....	18
1.4.2	Classificação.....	19
1.5	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1).....	22
1.6	Moléculas de adesão celular, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 e fator de necrose tumoral alfa na artrite reumatoide e na síndrome metabólica.....	23
1.7	Atividade da AR.....	25
1.8	Influência de medicamentos nas MAC.....	26
2.0	JUSTIFICATIVA	28
3.0	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4.0	CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
4.1	Aspectos Éticos.....	30
4.2	Delineamento.....	30
4.3	Medidas Antropométricas e Determinação da Pressão Arterial.....	31
4.4	Exames Laboratoriais.....	31
4.4.1	Marcadores Imunológicos e Bioquímicos.....	31
4.4.2	Moléculas de adesão células, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 e fator de necrose tumoral alfa	32
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5.0	RESULTADOS	34
6.0	ARTIGO	35

7.0. CONCLUSÃO	62
8.0 REFERENCIAS	63
9.0 ANEXOS E APÊNDICES	73
Anexo A. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina.....	73
Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	75
Apêndice B. Ficha de avaliação dos pacientes com Artrite Reumatoide.....	77

1.0 INTRODUÇÃO

1.1. Artrite Reumatoide

A Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune crônica, caracterizada pela inflamação e destruição articular e pela produção de autoanticorpos (GIBOFSKY, 2012). Autoanticorpos dirigidos a fração Fc das imunoglobulinas G (IgG), conhecidos como fator reumatoide (FR) e autoanticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) são produzidos em larga escala (MCINNES; SCHETT, 2011). É a doença autoimune sistêmica mais comum, com prevalência mundial estimada em torno de 1%. (GABRIEL; MICHAUD, 2009). A AR é associada a uma redução na mobilidade, incapacitação para o trabalho, baixa qualidade de vida e mortalidade aumentada. Aproximadamente um quarto dos pacientes diagnosticados com AR apresenta incapacitação para o trabalho dentro de três anos após o diagnóstico, e essa taxa aumenta para 35% em até 10 anos (ALLAIRE et al., 2008).

O diagnóstico é realizado com base nas manifestações clínicas e em exames laboratoriais. Em casos em que a forma de apresentação diverge da descrição clássica, o diagnóstico pode se tornar um desafio. Atualmente o diagnóstico de AR é baseado em critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) / Liga Europeia de Reumatismo (EULAR) de 2010, que compreende: número e tipo de articulações afetadas, presença do FR e/ou anti-CCP, proteínas de fase aguda (velocidade de hemossedimentação – VHS e proteína C reativa- PCR) e duração dos sintomas. É atribuído um escore para cada item, e caso a somatória resulte em um número maior ou igual a seis, indica presença de AR (ALETAHA et al., 2010).

O desenvolvimento de AR é multifatorial, apresentando fatores hereditários. Ocorre uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais (MCINNES; SCHETT 2011). Mais de 80% dos indivíduos afetados apresentam o epítipo HLA-DRB1*04 (SMOLEN et al., 2007), sendo que pacientes que possuem dois desses alelos possuem elevado risco de desenvolver a doença nodular e necessidade de intervenção cirúrgica relacionada a destruição articular (WEYAND et al., 1992). O epítipo compartilhado (EC) é uma sequência de aminoácidos comuns nas posições 70-74 do HLA-DRB1, e tem uma associação reconhecida com a produção de autoanticorpos anti-CCP. Além disso, o EC é um fator de risco para destruição óssea severa (HUIZINGA et al., 2005).

O fator de risco ambiental para AR melhor estabelecido é o tabagismo, porém os mecanismos exatos pelos quais essa prática favorece o desenvolvimento de AR permanecem desconhecidos. Os componentes inalados podem induzir a citrulinização de peptídeos, o que levaria à formação de autoanticorpos (KLARESKOG et al., 2006). Os radicais livres presentes na fumaça do tabaco também poderiam determinar mecanismos de ativação epigenéticas que influenciariam o desenvolvimento da AR e outras doenças autoimunes (HITCHON; EL-GABALWY, 2004).

Agentes infecciosos (vírus Epstein-Barr, Citomegalovirus, *Proteus* e *Escherichia coli*) e seus produtos também têm sido relacionados ao desenvolvimento de AR, possivelmente por um mecanismo de mimetismo molecular. A formação de imunocomplexos durante o curso dessas infecções poderia ocasionar a indução da produção do FR, um autoanticorpo dirigido à porção Fc das imunoglobulinas. O FR é um biomarcador para AR que tem sido implicado em sua patogênese (MCINNES; SCHETT 2011). Autoanticorpos anti-CCP, dirigidos a peptídeos próprios modificados por citrulinização, estão presentes em aproximadamente dois terços dos pacientes com AR, e são raros na população em geral ou em outras doenças inflamatórias (SHELLEKENS et al., 2000; VAN GAALES et al., 2004). Como esses anticorpos precedem em anos o surgimento das manifestações clínicas da AR, existe a possibilidade de estarem envolvidos em seu desenvolvimento (RANTAPAA-DAHLQVIST et al., 2003; NIELEN et al., 2004). Altos títulos do FR se correlacionam a um risco aumentado de desenvolvimento de AR, e a presença de anti-CCP ao diagnóstico se associa a uma progressão radiológica mais intensa e forma mais grave da doença (GAVRILÃ et al., 2016).

A membrana sinovial é um tecido conjuntivo formado por duas camadas principais. Em pacientes com AR, ocorre característica hiperplasia celular, angiogênese e infiltração de células inflamatórias que se proliferam de forma invasiva e destroem cartilagem e ossos. A hiperplasia sinovial, chamada de pannus, consiste em um aumento na espessura da membrana superior ocasionada por proliferação celular, recrutamento de células da circulação sanguínea, redução na apoptose celular e aumento da demanda de oxigênio com consequente hipóxia (MIHALY et al., 2014; JONGBLOED et al., 2006).

As articulações dos pacientes com AR apresentam diversas células ativadas do sistema imune, incluindo mastócitos, macrófagos, células dendríticas, células natural *killers*, linfócitos T (LT), linfócitos B (LB), células endoteliais e fibroblastos sinoviais. Essas células participam ativamente no processo inflamatório, sendo a destruição articular mediada pela ativação dos osteoclastos, condrócitos e fibroblastos sinoviais. A sinovite ocorre quando leucócitos infiltram a sinóvia por meio da migração celular. A migração celular é ocasionada pela

ativação endotelial da microvasculatura sinovial, que aumenta a expressão de moléculas de adesão (incluindo integrinas, selectinas e membros da superfamília das imunoglobulinas) e quimiocinas (MCINNES; SCHETT, 2011; HWANG, 2017). O revestimento sinovial torna-se hiperplásico e a membrana sinovial se expande, formando vilosidades. A inflamação persistente culmina na destruição óssea e da cartilagem por uma variedade de mecanismos (figura 1) (CHOY, 2012; STAMP et al., 2012). Os neutrófilos recrutados degranulam e liberam uma variedade de enzimas e peptídeos com potencial lesivo e também podem gerar diversos radicais livres, como superóxido e radical hidroxila (STAMP et al., 2012).

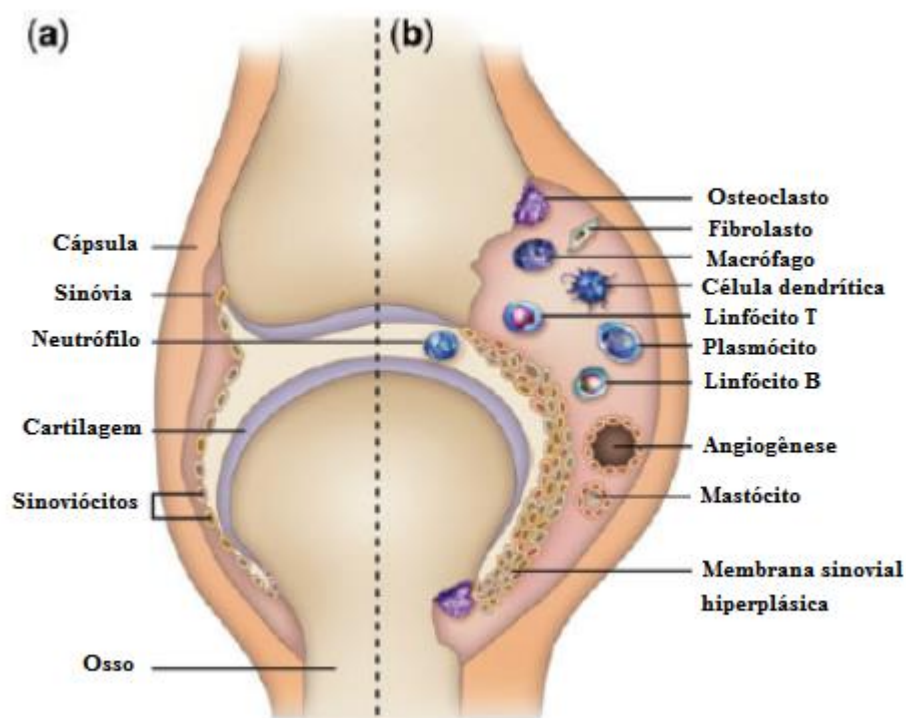


Figura 1: Articulação normal (a) e articulação afetada por AR (b): hiper celularidade e destruição articular.

Adaptado de: CHOY, 2012. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v3_v11, n. 51, 2012.

As manifestações articulares são decorrentes da inflamação do tecido sinovial que envolve as articulações periféricas das mãos, dos pés e dos pulsos. A AR é associada a um maior risco de morbidade e mortalidade por desenvolvimento precoce de doenças cardiovasculares e pulmonares. Os sintomas extra-articulares são aqueles que não estão diretamente relacionados ao sistema locomotor, acometendo cerca de 40% dos pacientes com AR (CIMMINO et al., 2000). O risco de doenças cardiovasculares (DCV) já é elevado até dois anos antes do diagnóstico de AR. Pode-se especular que a inflamação sistêmica aumente

a chance de aterosclerose mesmo antes de afetar as articulações (KREMERS et al., 2005). As manifestações pulmonares são uma importante causa de mortalidade e podem ser causadas diretamente pela AR ou por alterações imunes ocasionadas pelas medicações utilizadas em seu tratamento (MARIGLIANO et al., 2013). Os nódulos reumáticos constituem a manifestação epidérmica mais comum (COJOCARU et al., 2010). Podem ainda ocorrer manifestações renais (ICARDI, et al., 2003) e hematológicas (ARUL; KUMAR, 2016).

Existem poucos biomarcadores aceitáveis para o diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento da AR (KLARESKOG; CATRINA, 2009). A descoberta dos autoanticorpos anti-CCP representou um avanço no diagnóstico, tendo em vista que aproximadamente dois terços dos pacientes com AR produzem esses anticorpos (PRUJIN et al., 2010). Tem sido demonstrado que o tempo de início do tratamento dos pacientes com AR influencia na progressão da doença. Amostras de soro de pacientes que vieram a desenvolver AR mostram que a quebra de tolerância imune pode ocorrer muitos anos antes do surgimento de sintomas. Autoanticorpos podem estar presentes até 10 anos antes do diagnóstico, com subsequente aumento nos níveis de PCR e outros mediadores inflamatórios. (ISAACS, 2010).

1.2. Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica (SM) é definida como um conjunto de fatores fisiológicos, bioquímicos, clínicos e metabólicos interconectados, que estão relacionados a um aumento no risco de DCV, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e aumento na taxa de mortalidade. É característico da SM um estado inflamatório de baixo grau, resultante de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. São componentes da SM a resistência à insulina, acúmulo de gordura abdominal, dislipidemia, disfunção endotelial, aumento na pressão arterial e um estado de hipercoagulabilidade (KAUR, 2014). O conceito da SM existe há mais de 90 anos. Esse conjunto de alterações metabólicas foi primeiramente descrito em 1920, pelo médico sueco Kylin, como uma associação de hipertensão, hiperglicemia e gota (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

O reconhecimento da SM foi acompanhado pela dificuldade em se criar um critério diagnóstico universal, por debates contínuos a respeito da etiologia e fisiopatologia e por incertezas sobre como realizar o seu tratamento. Posteriormente foram definidos critérios diagnósticos por algumas instituições, como por exemplo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Programa Nacional de Educação para o Colesterol (NCEP-ATPIII) dos Estados Unidos e pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (LESLIE, 2005).

Os fatores de risco predominantes para SM parecem ser a obesidade abdominal e a resistência à insulina. Muitos estudos indicam que o acúmulo de gordura visceral é fortemente associado à resistência à insulina. Na presença da obesidade, o tecido adiposo produz um excesso de citocinas pró-inflamatórias com redução na produção de adiponectina, o que pode levar ao estado inflamatório encontrado na SM. Esse estado inflamatório crônico se reflete na elevação nos níveis de PCR, TNF- α , fibrinogênio e IL-6. Essas citocinas podem colaborar na resistência à insulina nos tecidos adiposo e muscular (GRUNDY et al., 2005; LUSIS; ATTIE; REUE, 2008). O estresse oxidativo característico da obesidade pode estar relacionado ao estado inflamatório encontrado na SM, e acredita-se que seja ao menos em parte responsável pela desregulação na secreção de adipocinas encontrada em células adiposas hipertrofiadas (SRIKANTHAN et al., 2016). Como consequência da presença de um estado inflamatório de baixo grau, ocorre disfunção endotelial com aumento na expressão de moléculas de adesão. (ZAMBON et al., 2005).

Uma vez que existem diferentes critérios para identificação da SM, estudos de prevalência podem encontrar resultados diversos. Mesmo com essa limitação, é possível verificar que a prevalência varia de acordo com a etnia estudada e aumenta com a idade. Até recentemente, a SM e o DM2 eram consideradas doenças que acometiam apenas adultos. Porém, com o aumento na obesidade juvenil, ficou claro que essas doenças podem se iniciar mesmo em crianças (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

A prevalência da SM em pacientes com AR tem sido relatada como elevada (KEREKES et al., 2014). Em um estudo realizado em 2012 envolvendo 283 pacientes com AR e 226 controles, Da Cunha et al reportaram que 39% dos pacientes com AR e 19% dos controles apresentavam SM, e que a presença de SM se relacionava a atividade da AR (DA CUNHA et al., 2012). Karvounaris et al. relataram em 2007 que pacientes diagnosticados com AR e SM apresentavam maiores chances de desenvolver AR com atividade moderada a grave em relação à pacientes com AR sem a presença da SM. O processo inflamatório de baixo grau presente na SM pode influenciar na atividade da AR, levando a uma maior atividade da doença (KARVOUNARIS et al., 2007). Gremese e Ferraccioli sugeriram que a presença de SM pode levar a uma resposta menos efetiva ao tratamento da AR. Isso poderia ser explicado pelo efeito aditivo inflamatório da SM na AR, e pelo fato de que o processo patogênico das duas condições pode ocorrer por diferentes mecanismos fisiopatológicos (GREMESE; FERRACCIOLI, 2011).

De fato, a AR tem sido associada a muitos componentes da SM, como alterações na massa corpórea, dislipidemia qualitativa e quantitativa, um perfil característico de adipocinas

e resistência à insulina (KEREKES et al., 2014) (Figura 2). Alterações na composição corporal têm sido descritas em pacientes com AR, ocorrendo característica perda de massa magra concomitante a um aumento do tecido adiposo. Essa condição é conhecida como “caquexia reumatoide” e acredita-se que possa estar associada a um aumento na mortalidade em pacientes com AR assim como com a maior prevalência de SM encontrada nesses pacientes (ELKAN et al., 2009; ROUBENOFF, 2009).

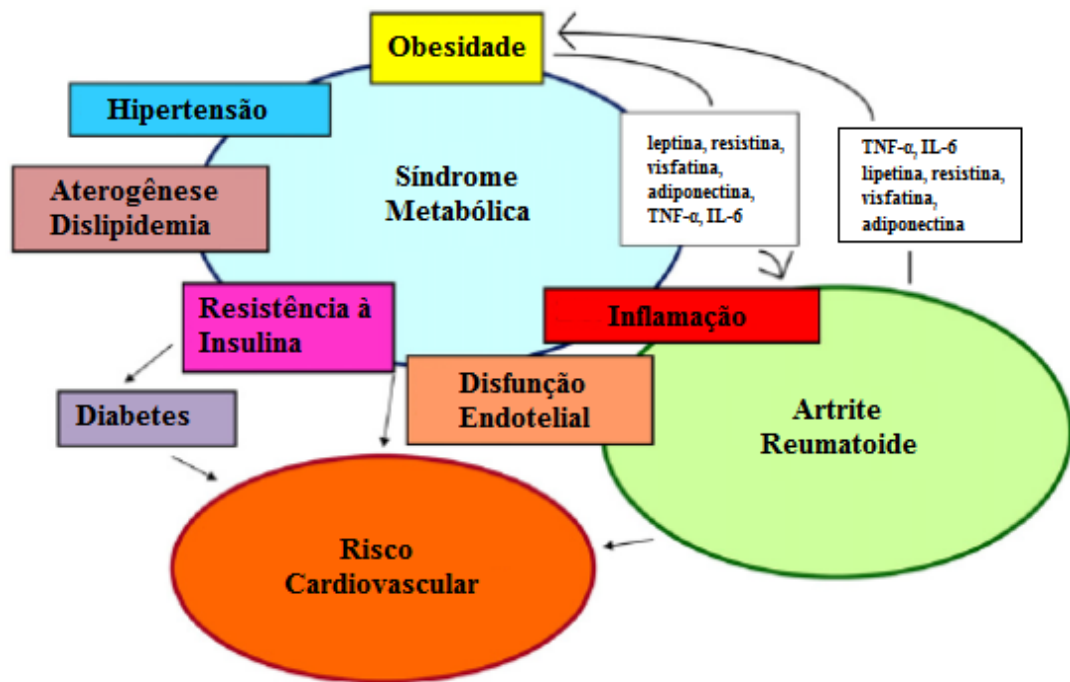


Figura 2: Síndrome metabólica como elo entre artrite reumatoide e risco cardiovascular. Adaptado de: GREMESE; FERRACCIOLI, 2011. The metabolic syndrome: The crossroads between rheumatoid arthritis and cardiovascular risk. *Autoimmun Rev*, v. 10, n. 10, p. 582–589, 2011.

1.3 Fator de Necrose Tumoral- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e monócitos, mas que também é expressa em LB, fibroblastos sinoviais, células *natural killers*, mastócitos, células endoteliais e osteoblastos. A produção excessiva de TNF- α tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias, como AR, Psoríase e Espondilite Anquilosante. Entre as propriedades inflamatórias do TNF- α estão a ativação endotelial, coordenação do recrutamento de células do sistema imune para os tecidos inflamados e promoção da destruição tecidual. (GREMESE; FERRACCIOLI, 2011; MERONI; VALESINI, 2014; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2015).

Um fator chave no processo inflamatório da AR é a produção excessiva de TNF- α , que é responsável por induzir a inflamação sinovial. A produção excessiva de TNF- α tem várias causas, incluindo interações entre LT e LB, fibroblastos sinoviais e macrófagos (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Sua principal função na patogênese da AR é aumentar a ativação dos monócitos e liberação de citocinas e prostaglandinas (MERONI; VALESINI, 2014). Diversos estudos demonstraram que essa citocina apresenta um importante papel na destruição articular local e na perda de massa óssea sistêmica, uma vez que pode induzir a reabsorção óssea mediada por osteoclastos (MANARA; SINIGAGLIA, 2014).

Gremese e Ferraccioli relataram em um artigo de revisão que em alguns estudos em pacientes com AR o tratamento prolongado com anti-TNF foi capaz de promover a sensibilidade à insulina, sugerindo que o TNF- α está envolvido na resistência à insulina observada nesses indivíduos. O TNF- α apresenta papel central na disfunção endotelial, e há evidências de que o bloqueio da atividade do TNF- α em indivíduos com AR reduza essa disfunção (GREMESE; FERRACCIOLI, 2011). Dentre os agentes biológicos utilizados para o tratamento da AR estabelecida, os medicamentos anti-TNF são normalmente utilizados de forma contínua, a não ser que seja observado que tenham se tornado ineficazes ou o paciente desenvolva algum efeito adverso importante (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

Na SM, os níveis de TNF- α também se apresentam elevados. O mRNA do TNF- α é expresso em níveis significativamente maiores em células adiposas de indivíduos obesos e os níveis desse mRNA estão relacionados positivamente à concentração de insulina plasmática, indicando que o TNF- α pode ter influência na resistência à insulina. Além disso, o TNF- α plasmático se correlaciona positivamente com componentes da SM, tais como resistência à insulina, massa corporal, circunferência abdominal, triglicérides, e inversamente ao HDL (CORNIER et al., 2008). O TNF- α é secretado por células hipertrofiadas do tecido adiposo visceral, que estão presentes caracteristicamente na SM. Uma vez que na SM ocorre desregulação no metabolismo dos adipócitos, e esses adipócitos desregulados tendem a produzir TNF- α , a obesidade central encontrada na SM pode ser considerada um fator de risco para a produção excessiva de TNF- α . Dessa forma, o TNF- α pode ter importante contribuição para o desenvolvimento e progressão das manifestações da SM (SRIKANTHAN et al., 2016).

As citocinas pró-inflamatórias, em especial o TNF- α , por um lado podem levar a uma disfunção metabólica e aumento no risco cardiovascular e por outro lado podem estimular ainda mais o processo inflamatório encontrado em pacientes com AR. Nesse contexto, um estudo retrospectivo realizado na Itália descreveu que pacientes com AR e obesidade (um dos

componentes da SM) apresentaram de 3-6 vezes menos chance de remissão da AR em comparação a pacientes não obesos com AR (GREMESE; FERRACCIOLI, 2011).

1.4 Moléculas de Adesão Celular (MAC)

1.4.1 Definição

MAC estão presentes na superfície celular e estão envolvidas nas interações célula-célula e célula-estroma (MÜLLER, 1995). As células apresentam um contato dinâmico entre si, de forma que possam processar informações complexas de estímulos externos ou responder a alterações no microambiente de forma coletiva e sinérgica (CHEN; WU, 2017). A adesão celular é crucial para a organização dos tecidos. Uma variedade de mecanismos de adesão celular é responsável por manter as células conectadas e organizadas na estrutura tecidual. As unidades funcionais da adesão celular são complexos multiproteicos compostos por três classes de proteínas: MAC, matriz extracelular e proteínas da membrana citoplasmática (GUMBINER, 1996). A adesão celular é resultado da múltipla ligação de diferentes MAC com seus ligantes específicos e envolve a intercomunicação e cooperação entre diferentes MAC, cada uma ligando-se a seus respectivos ligantes com afinidades diferentes. O evento da adesão celular varia de ligações muito estáveis a transitórias (CHEN; GUMBINER, 2006).

MAC são proteínas integrais de membrana e compreendem o domínio extracelular, transmembrana e citoplasmático. Essas moléculas podem se ligar a elas mesmas numa interação denominada homofílica, a superfície de outras moléculas (interação heterofílica), ou ambas. Podem ainda mediar a adesão entre duas células do mesmo tipo (adesão homotípica) ou de diferentes tipos (adesão heterotípica) (MCGARY; LEV; BAR-ELI, 2002). Elas também podem ser classificadas quanto à sua dependência de Ca^{2+} , sendo as integrinas, selectina e caderinas dependentes de Ca^{2+} , enquanto que a superfamília das Imunoglobulinas (IgSF) não o são (FREEMONT; HOYLAND, 1996).

Essas moléculas são liberadas na circulação e atuam como marcadores de ativação e disfunção endotelial, sendo reguladas positivamente por citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (SKEOCH et al., 2014) e detectadas em sua forma solúvel no soro humano e em outros fluidos corporais obtidas por meio de clivagem proteolítica (HIRATA et al., 2015).

1.4.2. Classificação

Existem quatro principais tipos de MAC: integrinas, membros da superfamília das imunoglobulinas (IgSF), selectinas e caderinas. No presente estudo foram avaliados os níveis das seguintes MAC: VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, E-selectina e P-selectina.

Integrinas

As integrinas são glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, compostas por cadeias α e β ligadas entre si por pontes dissulfeto, que compreendem um domínio extracelular, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática. Elas são secretadas por células epiteliais e são expressas em leucócitos. As integrinas podem ser divididas em dois subgrupos principais. O subgrupo $\beta 1$ ou VLA (“*very late antigen*”) engloba a maioria dos membros da classe. Já o subgrupo das $\beta 2$ integrinas é representado pelo receptor de linfócito LFA-1 (Molécula associada a função leucocitária tipo 1) e pelo Mac-1 (Antígeno macrófágico tipo 1) (PAN et al., 2016).

As integrinas primeiramente devem ser ativadas para que possam se ligar a seus receptores específicos e componentes da matriz extracelular. Os principais ligantes das integrinas são membros da IgSF, e a interação entre essas moléculas é essencial para a adesão dos leucócitos ao endotélio durante o processo de migração leucocitária. Além disso, durante um processo inflamatório o complemento é ativado seguido pela ativação de macrófagos para produção de citocinas, provavelmente com o envolvimento da $\alpha 4\beta 1$ integrina (SPRINGER 1990; XU; JIN, 2010; GOLIAS et al., 2011).

Superfamília das Imunoglobulinas (IgSF)

O conceito da IgSF foi proposto em 1980. Normalmente são glicoproteínas transmembrana, sendo uma grande parte delas MAC. Os membros da IgSF podem interagir entre si, com membros da família das integrinas ou ainda com outras moléculas (XU; JIN, 2010).

Os membros da IgSF são fortemente expressos em células endoteliais e sua estrutura é caracterizada por domínios repetidos similares aqueles das imunoglobulinas (GOLIAS et al, 2011). Em imunoglobulinas existem dois tipos de domínios, denominados V e C. O domínio V ou variável possui propriedades de ligação a antígenos enquanto o domínio C é responsável

pela realização de funções efetoras. O fragmento de ligação ao antígeno denominado Fab é formado por duas cadeias β antiparalelas ligadas entre si por uma ponte dissulfeto (BARCLAY, 2003).

Os membros dessa família importantes para doenças vasculares são as moléculas de adesão intercelular-1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2), molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1 (PECAM-1) e molécula de adesão celular-vascular-mucosa-1 (MADCAM-1). Os membros da IgSF são responsáveis pela firme adesão leucocitária durante o processo de migração e tem sua expressão aumentada em processos inflamatórios e imunológicos crônicos (GOLIAS et al., 2011; KLEIN et al., 1998; ZIMMERMAN; PRESCOTT; MCINTYRE, 1992).

ICAM-1 (CD54) é expressa por células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e fracamente por LB e monócitos (DUSTIN, 1986). Níveis séricos aumentados de ICAM-1 estão presentes em diferentes condições inflamatórias, como nas doenças autoimunes, casos de encefalite e outros tipos de desordens imunológicas do sistema nervoso central (RAO et al., 2007).

VCAM-1 ou CD106 é uma glicoproteína de 90 kDA, induzida e expressa principalmente por células endoteliais por estímulos extracelulares, como espécies reativas de oxigênio (EROS) e citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1. Apresenta papel fundamental na ligação de leucócitos a células endoteliais e na migração celular durante o processo inflamatório (KIM et al., 2017). VCAM-1 é expressa na superfície de células endoteliais ativadas, fibroblastos, macrófagos teciduais e células dendríticas. Dados da literatura têm relacionado ICAM-1 e VCAM-1 com doenças glomerulares (SKEOCH et al., 2014). A VCAM-1 é envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a viscosidade leucocitária e de células vasculares durante processos inflamatórios, reconhecimento imune celular, invasão tumoral e metástase e transdução de sinalização celular (WANG et al., 2015).

PECAM-1 (CD31) é uma proteína transmembrana de 130 kD, expressa na superfície de plaquetas, monócitos, neutrófilos e alguns subtipos de linfócitos e células endoteliais (NEWMAN, 1997). A PECAM-1 de superfície é um importante componente de junção intercelular em células endoteliais e realizam tanto ligações homofílicas com outras moléculas PECAM-1 quanto ligações heterofílicas com outras moléculas, como integrinas e glicosaminoglicanos (PIALI, 1995). Essas ligações estão envolvidas no processo de extravasamento leucocitário (VOLIN, 2005). O caráter pro- inflamatório da PECAM-1 envolve principalmente a etapa final do recrutamento de leucócitos ao facilitar a abertura das

junções endoteliais (HUANG et al., 2006), e promover a migração de leucócitos mediada por quimiocinas (PRIVRATSKY; NEWMAN; NEWMAN, 2010).

Selectinas

Selectinas são lectinas transmembrana dependentes de cálcio que mediam o rolamento leucocitário na superfície vascular, o primeiro passo da adesão leucocitária durante processos inflamatórios. Leucócitos expressam a L-selectina, plaquetas ativadas expressam a P-selectina e células endoteliais ativadas expressam a E-selectina e a P-selectina. O rolamento leucocitário envolve interações rápidas e reversíveis das selectinas com um número limitado de ligantes glicosilados na superfície celular (MCEVER, 2015). Essas moléculas compartilham uma estrutura, que inclui um domínio N-terminal dependente de cálcio e mediam a interação inicial de baixa afinidade dos leucócitos com as células endoteliais durante a migração leucocitária (LEWIS; D'CRUZ, 2005). Níveis elevados das formas circulantes solúveis das selectinas foram relatados no soro de animais e pacientes com doenças inflamatórias (GEARING; NEWMAN, 1993; SKEOCH et al., 2014).

A P-selectina é expressa em plaquetas e em células endoteliais. A P-selectina ligada à membrana das células endoteliais auxilia o rolamento leucocitário interagindo com seu ligante *P-selectin glycoprotein ligand* (PSGL-1), que é constitutivamente expresso na superfície da maioria dos leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. A P-selectina é sintetizada e depois estocada em grânulos secretórios. Nas plaquetas, a P-selectina é estocada em grânulos alfa, enquanto em células endoteliais são estocadas em corpos de Weibel-Palade. Após ativação celular por diferentes estímulos, a P-selectina é expressa transitoriamente na superfície celular como uma proteína transmembrana ou secretada no plasma como uma proteína solúvel (PATEL et al., 1991; HATTORI et al., 1989; GENG et al., 1990; HUMBRIA et al., 1994).

A E-selectina é uma proteína transmembrana de 115 kD expressa por células endoteliais ativadas por meio de síntese *de novo* (BEVILACQUA et al., 1987). É amplamente expressa em locais de inflamação na vasculatura e pode funcionar como receptor de “*homing*” tecido-específico para subgrupos de células T. Seus principais ligantes são ligantes de E-selectina tipo 1 (ESL-1) e PSGL-1 (TEDDER et al., 1995). A E-selectina solúvel é liberada pelas células endoteliais em resposta a clivagem proteolítica. Uma vez que a E-selectina é importante para interação entre células endoteliais e leucócitos, uma das funções da E-selectina solúvel pode ser competir pelo seu ligante leucocitário (LO et al., 1991).

A L-selectina (CD62L) é expressa constitutivamente em subtipos de LT, incluindo células não ativadas. Também é expressa por neutrófilos e monócitos. Apresentam um importante papel no rolamento leucocitário. A expressão da L-selectina nos linfócitos e neutrófilos é regulada pela ação de endometaloproteases que clivam a L-selectina da membrana celular quando a célula é ativada. A perda da L-selectina é normalmente acompanhada pelo aumento na expressão de outros receptores de adesão. Com a clivagem da L-selectina da superfície dos leucócitos, ocorre aumento nos níveis plasmáticos da sua forma solúvel (sL-selectina) (TELEN, 2014).

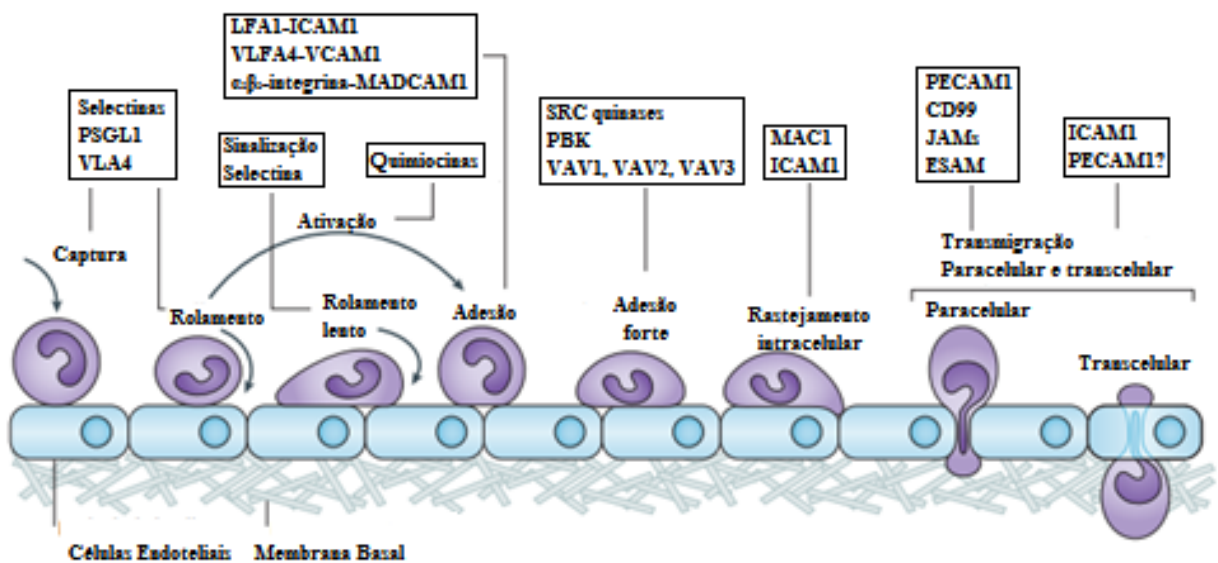


Figura 3: Cascata de adesão leucocitária: Recrutamento leucocitário e migração através do endotélio com envolvimento de diversas moléculas de adesão.

Adaptado de: LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. (2007) Getting to the site of inflammation : the leukocyte adhesion cascade updated. Nature, v. 7, p. 678–689.

1.5 Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)

PAI-1 é uma glicoproteína de 47 kD, que consiste de 379 ou 381 aminoácidos, sintetizado por vários tipos celulares, como adipócitos, hepatócitos, plaquetas, megacariócitos, macrófagos, placenta, células musculares lisas e células endoteliais. O ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e o PAI-1 influenciam diretamente a formação e degradação de trombos. É um membro da família dos inibidores de proteases serina (serpin), e sua principal função é interagir com o uPA/tPA por meio de uma ligação covalente, resultando na inibição da conversão de plasminogênio à plasmina. Níveis elevados de PAI-1

têm sido associados à obesidade, resistência à insulina, diabetes e DCV. PAI-1 é uma molécula pró-coagulante, pró-inflamatória e pró-fibrótica (GHOSH; VAUGHAN, 2012).

Os níveis plasmáticos de PAI-1 são elevados em pacientes obesos com SM, sendo que a concentração aumenta de acordo com a gravidade da doença. Estudos indicam que a redução na resistência à insulina é acompanhada por uma redução no PAI-1, assim como a redução no IMC. O aumento nos níveis de PAI-1 na SM está associado à deposição de gordura visceral, tendo sido demonstrado aumento no PAI-1 mRNA nessas células do tecido adiposo. O aumento nos níveis de TNF- α também pode induzir o aumento na produção de PAI-1, juntamente com aumento na resistência à insulina. Além disso, o estresse oxidativo característico da SM pode induzir as células adiposas a produzirem PAI-1 (ALESSI; JUHAN-VAGUE, 2006).

A deposição intra-articular de fibrina é uma característica marcante da AR. Estudos em camundongos com deficiência na produção de PAI-1 revelaram maiores níveis na atividade fibrinolítica sinovial, resultando em menos acumulação de fibrina nas articulações e redução na gravidade da doença (LINJEN, 2004). A interleucina-1 e o TNF- α podem estar associados ao estímulo na produção de PAI-1 e u-PA em células endoteliais (VAN HINSBERG et al., 1990; VAN HINSBERG et al., 1990). Aumento nos níveis de PAI-1 e redução nos níveis de t-PA podem resultar na redução da fibrinólise em pacientes com atividade da doença moderada a grave (KOPEIKINA et al., 1997).

1.6 Moléculas de adesão celular, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 e fator de necrose tumoral alfa na artrite reumatoide e na síndrome metabólica.

Leucócitos recrutados da corrente sanguínea para o espaço extra vascular são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória apropriada em decorrência de uma lesão ou infecção. Em muitos tecidos, esse processo segue uma cascata de eventos bem definida, começando com a captura de leucócitos da corrente sanguínea para a parede do vaso, seguida pelo rolamento e adesão desses leucócitos no endotélio inflamado e pela migração transendotelial. Estudos demonstraram que várias citocinas e MAC são essenciais para esse processo (BUTCHER, 1991; PETRI et al., 2008).

Em geral, MAC se encontram com a expressão elevada em tecidos sinoviais de pacientes com AR, onde desempenham importantes funções no recrutamento de leucócitos da circulação sanguínea. Devido a importância das MAC na formação da inflamação articular, elas têm sido alvos terapêuticos para o tratamento da AR (VOLIN, 2005).

MAC solúveis possuem importante papel na patogênese da AR. Elas podem resultar do seu desprendimento da superfície celular ou pela secreção em vesículas citoplasmáticas. As funções dessas MAC solúveis são diversas, e ainda não é certo seu papel no processo inflamatório, porém elas parecem estar relacionadas ao processo inflamatório da AR (VOLIN, 2005), e o processo acelerado de aterogênese que acompanha a AR está ligado a ativação e disfunção endotelial (SURDACKI, 2007).

Na ausência de inflamação, o endotélio serve como barreira entre a corrente sanguínea e a parede dos vasos. Apresentam também funções indispensáveis: 1) modulação da homeostase; 2) controle da hemodinâmica vascular; 3) regulação da permeabilidade vascular, coagulação e passagem celular da corrente sanguínea aos tecidos (DAVIDSON, 2010).

Nos processos inflamatórios, a ativação das células endoteliais induz aumento na permeabilidade vascular, a expressão de citocinas, quimiocinas e enzimas, e a produção de MAC. O NF- κ B (Nuclear transcription factor- κ B) regula a expressão de MAC, como a ICAM-1, VCAM-1 e a E-selectina, que são importantes nas interações entre leucócitos e endotélio (YANG et al., 2016).

A disfunção e ativação endotelial se reflete nos altos níveis de MAC leucocitária (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina), aumento nos níveis do fator de von Willebrand (importante mediador da adesão plaquetária ao endotélio, também envolvido na manutenção dos níveis plasmáticos de fator VIII), e uma alteração endotelial para um estado pró-trombótico. A disfunção endotelial é amplamente mediada pela redução de óxido nítrico biodisponível, com uma provável contribuição do aumento nos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da síntese de óxido nítrico (KLIMEK, 2014). As MAC e o PAI-1 possuem um importante papel na patogênese da aterosclerose. Um aumento na expressão de MAC tem sido encontrado em placas ateroscleróticas, e os níveis de suas formas solúveis têm sido relacionadas às suas expressões na superfície celular (GIANNOTTI; LANDMESSER, 2007).

DCV são sérias complicações a longo termo para pacientes com doenças inflamatórias, incluindo AR e lúpus eritematoso sistêmico (RIDKER et al., 2000; KU et al., 2009). O fator de transcrição nuclear NF- κ B regula a expressão de MAC. Quimiocinas, como IL-8, contribuem para a resposta de células endoteliais na inflamação, que se inicia pela ativação clássica do NF- κ B (KEMPE et al. 2005). O processo inflamatório da AR e de DCV são muito similares, sugerindo que a inflamação relacionada a AR pode contribuir para o aumento de risco cardiovascular nesses pacientes (SPASOVSK et al., 2013).

As MAC possuem um importante papel no desenvolvimento da SM e do DM2, assim como nas complicações relacionadas a essas doenças (SCHARAM; STEHOUWER, 2005). Pacientes com SM apresentam um característico estado inflamatório subclínico, que pode modular o processo aterogênico, resultando em: (1) disfunção endotelial e aumento na expressão de MAC e PAI-1; (2) aumento no recrutamento de monócitos para a parede arterial no início do processo aterogênico, levando a (3) formação de uma placa aterosclerótica instável, rica em células inflamatórias, responsável pela maioria dos eventos cardíacos e cerebrovasculares observados na SM (ZAMBON; PAULETTO; CREPALDI, 2005).

Sakamoto et al verificaram que o TNF- α é capaz de induzir a produção de PAI-1 em células adiposas, sendo os efeitos dependentes da concentração do TNF- α e do tempo de exposição a essa citocina (SAKAMOTO et al., 1999). Plomgaard et al. reportaram que o TNF- α em concentrações acima do normal é capaz de induzir a expressão do mRNA PAI-1 em tecidos adiposos humanos (PLOMGAARD et al., 2004). Os níveis de PAI-1 têm sido encontrados elevados em pacientes com AR (KOPEIKINA et al., 1997; WALLBERG-JONSSON et al., 2002). Além disso, estudos demonstraram associação dos níveis de PAI-1 com a atividade da AR mensurada pelo DAS28-ESR (SÖDERGREN et al., 2010) e pelo Stoke index (KOPEIKINA et al., 1997).

1.7 Atividade da AR

A atividade da AR pode ser determinada pelo DAS (*disease activity score*) que foi criado no início da década de 90, consistindo em uma avaliação de articulações pelo Ritchie articular index e pela contagem de articulações edemaciadas, em conjunto com a escala visual analógica de saúde global segundo o paciente (VAS) e o VHS (VAN DER HEIJDE et al., 1990, VAN DER HEIJDE et al., 1992). Em 1995, o mesmo grupo de pesquisadores publicou um artigo científico relatando o desenvolvimento e a validação de um novo índice de avaliação da atividade da doença utilizando a contagem de 28 articulações, o DAS28 (PREVOO et al., 1995). Nesse novo estudo, verificaram que o DAS28 apresentou a mesma capacidade discriminatória da atividade da doença que o DAS original. Foi definido que uma pontuação inferior a 2,6 indicava remissão da doença, entre 2,6 a 3,2 como atividade baixa, acima de 3,2 a 5,1 como atividade moderada e acima de 5,1 como grande atividade (Tabela 1).

Pontuação	Atividade
< 2,6	Remissão da doença
2,6 a 3,2	Atividade leve
> 3,2 a 5,1	Atividade moderada
> 5,1	Atividade alta

Tabela 1. Índice da atividade da artrite reumatoide mensurado pelo DAS28-VHS.

Em 2004, Fransen et al. sugeriram a substituição do VHS pelo PCR como parâmetro laboratorial no cálculo do DAS28. A justificativa apresentada foi que o VHS estaria sujeito a variações de acordo com a idade, sexo, etnia e níveis de proteínas plasmáticas, enquanto o PCR representaria melhor as alterações inflamatórias em curto prazo (FRANSEN et al., 2004).

Inoue et al. reportaram que o DAS28-VHS e o DAS28-PCR apresentaram um coeficiente de correlação de 0,946. Porém, ao avaliar as curvas ROC, verificaram que o DAS28-PCR pode subestimar a atividade da doença, principalmente em escores mais baixos. Dessa forma, recomendaram cautela ao se utilizar o DAS28-PCR para definir o manejo terapêutico da AR (INOUE et al., 2007). Medeiros e colaboradores conduziram um estudo em 2015 em que compararam a utilização do VHS com o PCR no DAS28. Eles relataram que os níveis do DAS28-VHS foram significativamente maiores que os do DAS28-PCR, e que a atividade da doença pode ser subestimada quando utilizado o PCR (MEDEIROS et al., 2015).

1.8 Influência de medicamentos nas MAC

O endotélio é o principal regulador da homeostase vascular. Um endotélio vascular saudável é essencial para manutenção do tônus vascular, *status* de coagulação e proliferação das células musculares lisas. A terapia com anti-TNF em conjunto com outros medicamentos tem demonstrado reduzir diversos fatores de risco para doenças cardiovasculares em pacientes com AR. Existem evidências que a terapia com anti-TNF pode melhorar a função endotelial,

com redução do espessamento da parede arterial e do desenvolvimento de aterosclerose subclínica (URSINI et al., 2017).

EM 2015, Wang et al. estudaram os níveis de VCAM-1 em pacientes com AR. Inicialmente, observaram altos níveis de VCAM-1 em pacientes com AR em comparação a controles saudáveis. Após seis meses de tratamento com medicamentos anti-inflamatórios, antirreumáticos, anti-TNF e em casos específicos, corticoides, verificaram uma redução significativa nos níveis de VCAM-1, obtendo-se valores próximos aos encontrados no grupo controle (WANG et al., 2015). Smith et al. relataram que o tratamento com drogas modificadoras do curso da doença foi capaz de induzir uma redução nos níveis de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina na membrana sinovial (SMITH et al., 2001). Klimiuk et al. conduziram um estudo em 2007 em que verificaram que os níveis de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina estavam aumentados em pacientes com AR diagnosticada a menos de três anos. Com o tratamento com metotrexato, houve melhora clínica concomitantemente com uma redução significativa nos níveis dessas três MAC (KLIMIUK et al., 2007).

O recrutamento leucocitário é crucial para o desenvolvimento da inflamação, sendo as MAC essenciais nesse processo. Aumento na expressão de MAC, como E-selectina, ICAMs, VCAMs e LFA-1 tem sido descrito em várias células sinoviais em pacientes com AR. O tratamento com drogas modificadoras do curso da doença, corticoides e agentes biológicos tem a capacidade de reduzir a expressão das MAC. Tratamentos que atuem diretamente na expressão das MAC podem ser capazes de obter bons resultados para o tratamento da AR (HARINGMAN et al., 2005).

2.0 JUSTIFICATIVA

Os dados na literatura sobre as MAC na AR ainda são escassos e controversos. Pacientes com AR apresentam aumento na prevalência de SM e isso poderia favorecer ainda mais o processo inflamatório com consequente aumento das MAC na AR. Não é de nosso conhecimento, até o momento, estudo prévio que tenha avaliado o efeito da SM nas MAC e no PAI-1 em pacientes com AR. Também há poucos dados sobre o envolvimento das MAC e PAI-1 na atividade da doença determinada pelo DAS28(VHS) e DAS28(PCR). O melhor entendimento da participação das MAC na AR e SM poderá fornecer evidências de possíveis biomarcadores laboratoriais de atividade da doença e novos alvos terapêuticos. Tendo em vista a complexidade da AR e a dificuldade encontrada para o diagnóstico em casos em que a apresentação clínica seja divergente da forma clássica da doença, a formulação de novos modelos que auxiliem no diagnóstico e atividade da AR poderia colaborar para um melhor manejo clínico desses pacientes.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis séricos de VCAM-1, PECAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, PAI-1 e TNF- α em pacientes com AR e a influência da síndrome metabólica.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar os níveis de VCAM-1, PECAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, PAI-1 e TNF- α em pacientes com AR e indivíduos saudáveis;
- Verificar se a presença de SM e/ou o uso de medicamentos podem modular os níveis de VCAM-1, PECAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina e PAI-1 em pacientes com AR;
- Determinar a possível associação entre as MAC, PAI-1 e o TNF- α com a presença da AR;
- Propor modelos preditores para o diagnóstico e atividade de AR, utilizando MAC, PAI-1 e outros biomarcadores inflamatórios relacionados à AR.

4.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE. 06405812.1.0000.5231), Parecer CEP/UEL nº 205.175, Anexo 1). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (Apêndice 1A e 1B).

4.2. Delineamento

Participaram deste estudo 259 indivíduos de ambos os sexos, sendo 144 pacientes com AR selecionados do Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil e 115 indivíduos controles selecionados entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina. Nenhum dos indivíduos estava recebendo dieta específica. Os pacientes com AR e controles não ingeriam álcool regularmente. Nenhum dos participantes apresentava doenças cardíacas, tireoidianas, renais, hepáticas, gastrointestinais, oncológicas ou outras doenças autoimunes, e não estavam recebendo reposição estrogênica ou suplementação antioxidante. Informações referentes a estilo de vida e histórico médico foram obtidas a partir de avaliação clínica de cada paciente.

O diagnóstico do AR foi realizado a partir dos critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia e da Liga Europeia Contra o Reumatismo, de 2010 (ALETAHA et al., 2010) e a atividade da doença foi determinada pelos escores DAS28-PCR e DAS28-VHS (PREVOO et al., 1995).

SM foi definida quando um indivíduo apresentou três ou mais das seguintes medidas: obesidade abdominal com circunferência abdominal ≥ 102 cm para homens, e ≥ 88 cm para mulheres; níveis de triglicerídeos ≥ 150 mg/dL; colesterol HDL menor que 40 mg/dL para homens e menor que 50 mg/dL para mulheres; glicose em jejum ≥ 100 mg/dL ou uso de hipoglicemiantes; e/ou PAS ≥ 130 mmHg e PAD ≥ 85 mmHg ou uso de anti-hipertensivos, de acordo com os critérios propostos pela “*American Heart Association*” (GRUNDY et al., 2005).

Inicialmente, foram separados dois grupos, sendo um formado por pacientes com AR e o outro com controles. Foi realizada comparação entre os resultados desses grupos para

diversos parâmetros clínicos e laboratoriais. Posteriormente, foi realizada nova separação dos indivíduos participantes desse estudo em dois grupos, dessa vez de acordo com a presença ou ausência de SM. Foram então comparados os níveis de MAC e PAI-1 desses grupos, com o objetivo de verificar se a presença de SM poderia estar interferindo nos resultados de MAC e PAI-1 obtidos nos indivíduos com AR.

4.3. Medidas Antropométricas e Determinação da Pressão Arterial

O peso corporal foi avaliado com aproximação de 0,1 kg utilizando uma balança eletrônica e com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da manhã; a altura foi medida com precisão de 0,1 cm, utilizando-se um estadiômetro. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. A circunferência abdominal (CA) foi medida com uma fita suave na região entre a última costela e a crista ilíaca, sempre com os indivíduos na posição em pé. Três medidas da pressão arterial foram registradas com intervalo de um minuto entre elas depois do indivíduo se sentar. A média destas medições foi utilizada na análise (PICKERING et al., 2005).

4.4. Exames Laboratoriais

Após jejum de 12h, foram coletadas amostras em tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante e com anticoagulante EDTA. O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. Plasma e soro foram obtidos após centrifugação (10 min 2500 rpm) e armazenados em freezer -80°C até o momento das análises quando as amostras não foram analisadas no mesmo dia. Todos os pacientes e controles e suas respectivas amostras foram identificados numericamente, de forma a garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos.

4.4.1. Marcadores Imunológicos e Bioquímicos

Os níveis de anticorpos anti-CCP foram determinados por Quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os níveis de glicose, HDL-colesterol e triacilgliceróis foram determinados em um autoanalisador bioquímico (Dimension Dade AR Dade Behring Deerfield, IL, EUA), utilizando kits Dade Behring®. Os níveis de

usPCR e de FR foram avaliados por Nefelometria (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany).

4.4.2. Moléculas de adesão células, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 e fator de necrose tumoral alfa

Os níveis de PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, E-Selectina, P-Selectina, PAI-1 e TNF- α foram determinados pelo kit Human Magnetic Adhesion 6-Plex Panel (Novex Life Technologies, Frederick, United States of America) para plataforma Luminex®.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) ou o teste de Kruskal-Wallis foram utilizados para verificar diferenças entre grupos em variáveis contínuas, enquanto análise de tabelas de contingência (teste X^2) foram utilizadas para examinar associações entre dois conjuntos de variáveis categóricas. Os resultados de comparações múltiplas tiveram o valor de p corrigidos para reduzir a possibilidade de resultados falsamente significativos (BENJAMINI, 1995). Utilizou-se análise multivariada modelo linear geral (GLM) para delinear os efeitos multivariados do diagnóstico (AR) e SM (como variáveis explanatórias primárias) sobre as variáveis dependentes (MAC), controlando os resultados para sexo, idade, IMC e SM. Conseqüentemente, testes de efeitos entre sujeitos foram posteriormente utilizados para verificar efeitos univariados das variáveis explanatórias estatisticamente significativas e cada uma das 6 MAC. Médias gerais estimadas (GLM) foram computadas para cada uma das MAC. Análise de regressão logística binária (automatic stepwise) foi utilizada para determinar as variáveis explanatórias que significativamente predisseram a AR como variável dependente e controles como grupo de referência. Medida de Nagelkerke e a porcentagem de casos classificados corretamente com sensibilidade e especificidade foram utilizadas como estimativas do tamanho do efeito ou acurácia da capacidade classificatória. Análises de regressão (automatic stepwise) foram empregadas na avaliação do DAS28-PCR e DAS28-VHS como variáveis dependentes e as MAC, SM e IMC como variáveis explanatórias primárias e o TNF- α e o PCR como variáveis explanatórias secundárias, ajustando para sexo e idade. Todas análises foram realizadas no IBM SPSS para Windows, versão 22. Os testes foram bi-caudais, e alfa de 0,05 indicou um efeito estatístico significativo.

5.0 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico intitulado: **“Cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in patients with rheumatoid arthritis: influence of metabolic syndrome”** enviado para a revista *Clinical & Experimental Immunology* com fator de impacto 3,41.

6.0 ARTIGO

Cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in patients with rheumatoid arthritis: influence of metabolic syndrome

CAM and PAI-1 in RA: influence of MetS

Marcelo Cândido de Sá¹, Andréa Name Colado Simão², Fabiano Aparecido de Medeiros¹, Tatiana Veiga Mayumi Iriyoda³, Neide Tomimura Costa⁴, Daniela Frizon Alfieri¹, Tamires Flauzino¹, Bruno Alexandre Sekiguchi¹, Marcell Alysson Batisti Lozovoy², Edna Maria Vissoci Reiche², Michael Maes⁵, Isaias Dichi⁶.

1. Research Laboratory in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
2. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology; Research Laboratory in Applied Immunology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
3. Department of Rheumatology, Pontifical Catholic University of Paraná (PUC/PR), Londrina, Paraná, Brazil.
4. Department of Rheumatology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
5. IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, VIC, Australia.
6. Department of Internal Medicine – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

* Corresponding author: Andréa Name Colado Simão.

Postal address: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Rua Robert Koch, n 60. University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440. Tel.: +55-43-3371-2321; Fax: +55-43-3371-2619.

Key words: rheumatoid arthritis, cell adhesion molecules, plasminogen activator inhibitor type-1, metabolic syndrome, tumor necrosis factor- α .

Abbreviations:

RA rheumatoid arthritis, CAM cellular adhesion molecule, DAS28 disease activity score 28, ESR erythrocyte sedimentation rate, CRP C-reactive protein, PAI-1 plasminogen activator inhibitor type-1, VCAM-1 vascular cell adhesion molecule 1, TNF- α tumor necrosis factor- α , PECAM-1 platelet endothelial cell adhesion molecule 1, NF- κ B Nuclear transcription factor-kappa B, ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1, MetS metabolic syndrome, HDL high density lipoprotein, BMI body mass index, WC waist circumference, anti-CCP anti-cyclic citrullinated peptide antibody, hsCRP highly sensitive CRP.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory and systemic disease characterized by endothelial activation. The main objective of this study was to verify the profile of cell adhesion molecules (CAM) in RA patients, and the influence of metabolic syndrome (MetS) and drugs used in the treatment of RA in this profile. A second objective was to propose models of prediction of activity in RA using these biomarkers. 115 healthy individuals and 144 RA patients were enrolled. Disease activity was determined by DAS28 (disease activity score 28) based on erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR) or C- reactive protein (DAS28-CRP). Serum CAM and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), anthropometric and immunological parameters were measured. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) was significantly decreased and PAI-1 was significantly higher in RA patients as compared to controls. Binary logistic regression analysis showed that VCAM-1, CRP, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) predicted RA with a sensitivity of 95,9% and a specificity of 89,5%. 42,9% of the variance in DAS28-ESR and 49,2% of the variance in DAS28-CRP is explained by increased PAI-1, TNF- α , body mass index and decreased platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1). MetS is characterized by increased PAI-1, E-selectin and P-selectin levels. Our data show that lower levels of VCAM-1 are associated with RA independently of MetS, while increased PAI-1 and lowered PECAM-1 are associated with RA disease activity. PAI-1, VCAM and PECAM-1 play a role in the pathophysiology of RA, whereas PAI-1, E-selectin and P-selectin play a role in the pathophysiology of MetS. The drugs used in the treatment of RA had practically no influence on the levels of CAM.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic chronic inflammatory disease characterized by extensive synovitis [1]. The disease manifestations include cartilage and bone destruction and systemic features, including cardiovascular, pulmonary, neuro-psychiatric and skeletal disorders [2]. TNF- α is the main cytokine involved in the inflammatory response of RA [3] and is able to directly impair endothelial function reducing nitric oxide synthase expression. It also leads to NF- κ B activation and reactive oxygen species accumulation in endothelial cells [4]. TNF- α has a crucial role in joint destruction, increasing cellular infiltration in the synovium through enhancing chemokines expression, endothelial activation, and angiogenesis and may induce the expression of cell adhesion molecules on endothelial cells and leucocytes [5, 6].

Cellular adhesion molecules (CAM), such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell-adhesion-molecule-1 (VCAM-1), platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1 (PECAM-1), E-selectin, and P-selectin may be found in the circulation. They regulate adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells, a hallmark of the inflammatory process, and participate in transmigration processes through the endothelium and promote cell-cell interactions in the immune response [7]. In addition, CAM are cell surface molecules that are involved in cell-matrix interactions [8]. Although several factors are involved in the elevation of local expression as well as in serum adhesion molecules levels, chronic inflammation and endothelial dysfunction are key components [9, 10]. Several studies have evaluated different CAM and reported conflicting results in patients with RA when compared with healthy controls [11, 12, 13, 14].

Metabolic syndrome (MetS) consists of a cluster of metabolic abnormalities, mainly obesity and impaired glucose tolerance [15]. RA patients showed high incidence of MetS that

could contribute to inflammation and imbalance of adhesion molecules and PAI-1 [16, 17]. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1), the most important endogenous suppressor of fibrinolysis, is also powerfully upregulated by TNF- α level [18; 19].

The few studies that investigated associations between CAM, MetS with DAS28 reported contradictory results. Gonzales-Gay et al [20] found no correlation between DAS28-ESR and either ICAM-1, VCAM-1, E-selectin or P-selection, whereas Södergren et al [21] reported that DAS28-ESR was associated with PAI-1, tissue plasminogen activator tPA-mass concentration and inversely to VCAM-1. Da Cunha et al. [22] demonstrated that DAS28-ESR was associated with MetS. However, we are not aware of any study which has evaluated the association between CAM and RA activity while controlling for MetS and drugs used in the treatment of RA.

Therefore, the main objective of this study was to verify the profile of CAM in RA patients, and the influence of MetS and drugs used in the treatment of RA in this profile. A second objective was to propose models for prediction of activity in RA using these biomarkers.

Subjects and Methods

Subjects

This study included 259 subjects, consisting of 115 healthy individuals and 144 RA patients. The control group was selected among blood donors of the University Hospital and RA patients were selected from the ambulatory of Rheumatology of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. RA was diagnosed using the 2010 rheumatoid arthritis classification criteria [23], and disease activity was determined using DAS28-ESR and DAS28-CRP scores [24, 25]. The patients were controlled by sex and MetS. None of the subjects was receiving a

specific diet. Controls and RA patients did not drink alcohol regularly. None of the participants presented heart, thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal, oncological or other autoimmune disease, and none was receiving estrogen replacement therapy or antioxidant supplements. Metabolic syndrome (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 [26].

This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and the Ethical committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil approved all procedures involving human subjects and patients (CAAE 06405812.1.0000.5231). Written informed consent was obtained from all subjects.

Anthropometric and Blood Pressure Measurements

Body weight was measured to the nearest 0,1 kg by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes, in the morning; 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. The waist circumference (WC) was measured with a soft tape in the region between the last rib and the iliac crest, always in the standing position. 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.

Biochemical and Immunological biomarkers

After fasting for 12h, the patients underwent the following laboratory blood analysis: anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP) was determined by chemiluminescence microparticle immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). hsCRP (highly sensitive CRP) and rheumatoid factor were measured using a nephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany). The levels of glucose, HDL cholesterol, and triacylglycerols were determined by a biochemical autoanalyser (Dimension Dade AR Dade Behring Deerfield, IL, EUA).

Adhesion Molecules, Plasminogen Activator Inhibitor Type-1(PAI-1) and TNF- α

Levels of PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin, PAI-1 and TNF- α were determined by Human Magnetic Adhesion 6-Plex Panel (Novex Life Technologies, Frederick, United States of America) for Luminex® platform.

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) or the Kruskal-Wallis test were employed to check differences between diagnostic groups in scale variables, whilst analysis of contingency tables (X^2 -test) was employed to assess associations between nominal variables. Results of multiple comparisons were p-corrected for false discovery rate [27]. Multivariate general linear model (GLM) analysis was used to delineate the effects of diagnosis (RA) and MetS (as primary explanatory variables) on the five CAM and PAI-1, while controlling for age, sex, BMI and MetS. Consequently, we used tests for between-subjects effects to assess the associations between the significant explanatory variables and each of the five CAM and PAI-1. GLM model-generated estimated marginal mean (SE) values of the adhesion molecules were computed. Automatic stepwise binary logistic regression analyses (forward LR method with

p-to-enter=0.05 and p-to-remove=0.051) was used to assess the significant explanatory variables predicting RA as dependent variable and controls as reference group. Nagelkerke values and the percentage of correctly classified cases with sensitivity and specificity were used as estimates of effect size or accuracy of the classification outcome. Automatic stepwise regression analyses was employed with the DAS28-ESR and DAS28-CRP values as dependent variables and the adhesion molecules, MetS and BMI as primary explanatory variables and TNF- α and CRP as secondary explanatory variables, while adjusting for age and sex. All analyses were performed using IBM SPSS Windows version 22. Tests were 2-tailed, and an alpha level of 0.05 indicated a statistically significant effect.

Results

Descriptive statistics

Table 1 shows the demographic, clinical and biomarker data in controls and patients with RA. We found 7 items which showed significant differences between both study groups. P-correction for FDR showed that these 7 variables remained significant after p-correction. Table 1 shows that RA patients were somewhat older and had a higher BMI than controls. There were no significant differences in sex ratio, waist circumference, and prevalence of MetS between both study groups. There were somewhat more smokers and no-Caucasians in the RA group. More RA patients than controls used antihypertensive drugs. TNF- α and CRP levels were significantly higher in RA patients than in normal controls.

Adhesion molecules and rheumatoid arthritis.

The correlation matrix among all five adhesion molecules and PAI-1 (computed on the total study sample) shows that PAI-1 is correlated with PECAM ($r=0.381$, $p<0.001$, and all $n=165$),

E-selectin ($r=0.421$, $p<0.001$) and P-selectin ($r=0.731$, $p<0.001$). PECAM was significantly correlated with VCAM ($r=0.503$, $p<0.001$), E-selectin ($r=0.688$, $p<0.001$) and P-selectin ($r=0.495$, $p<0.001$). There were no associations between ICAM and the other four adhesion molecules and PAI-1. VCAM was significantly correlated with E-selectin ($r=0.314$, $p<0.001$) and P-selectin ($r=0.246$, $p=0.001$), while E-selectin was correlated with P-selectin ($r=0.490$, $p<0.001$). The correlation matrix in RA showed comparable results.

In order to study the differences in adhesion molecules and PAI-1 between controls and RA patients we have performed a multivariate GLM analysis with the five adhesion molecules and PAI-1 as dependent variables and diagnosis (RA versus controls) and MetS as primary explanatory variables, while controlling for age, sex and BMI. **Table 2** shows the results of this multivariate GLM analysis indicating significant effects of RA and MetS, but not age and sex. RA explained around 18.9% of the variance in the five adhesion molecules and PAI-1, and MetS around 12.2%. **Table 3** shows the model-generated estimated marginal means (\pm SE) obtained by this GLM regression analysis. Table 3 and tests for between-subject effects show that PAI-1 is significantly higher in RA patients than controls, while VCAM is significantly lower in RA patients than controls. There were no significant differences in any of the other adhesion molecules between RA patients and controls.

Effects on confounding variables on adhesion molecules

Table 2 and 3 also show that MetS had a significant effect on PAI-1 and the adhesion molecules, namely E-selectin and P-selectin, which are significantly higher in subject with MetS than in those without. Entering BMI instead of MetS in the same GLM analysis showed that BMI ($F=5.93$, $df=6/152$, $p<0.001$) had a highly significant impact on the adhesion molecules and PAI-1 (partial eta squared=0.190), while the effects of diagnosis remained significant ($F=4.26$, $df=6/152$, $p=0.001$, partial eta squared=0.144). Tests for between-subject

effects showed that BMI had a significant effect on PAI-1 ($F=8.31$, $df=1/157$, $p=0.005$, partial eta squared=0.050), E-selectin ($F=25.69$, $df=1/157$, $p<0.001$, partial eta squared=0.141) and P-selectin ($F=6.52$, $df=1/157$, $p=0.012$, partial eta squared=0.040). There was no significant effect of ethnicity ($F=0.82$, $df=6/149$, $p=0.558$) and smoking behavior ($F=1.83$, $df=6/144$, $p=0.097$) on the adhesion molecules and PAI-1. We also examined the effects of the drug state on the adhesion molecules using multivariate GLM analysis. Methotrexate ($F=1.76$, $df=6/151$, $p=0.111$), antimalarial drugs ($F=0.29$, $df=6/151$, $p=0.942$), leflunomide ($F=2.03$, $df=6/148$, $p=0.066$) and antihypertensive drugs ($F=1.05$, $df=6/144$, $p=0.396$) did not have any effects on the adhesion molecules and PAI-1. Use of prednisone had a significant effect on the adhesion molecules ($F=2.68$, $df=6/148$, $p=0.017$), while tests for between-subject effects showed that prednisone increased levels of PAI-1 significantly. ($F=5.31$, $df=1/153$, $p=0.022$). Subjects without prednisone showed PAI-1 levels of 55.690 (7.956) and those with prednisone 72.313 (9928). Nevertheless, this effect showed a very modest effect size (partial eta squared=0.034).

Best predictors of rheumatoid arthritis diagnosis

Table 4 shows the outcome of automatic stepwise binary regression analysis with RA as dependent variable (and controls as reference group) and CAM, PAI-1, age, sex, BMI, MetS, and use of drugs as explanatory variables. Regression #1 shows that 4 variables significantly predicted RA ($X^2=70.47$, $df=4$, $p<0.001$; Nagelkerke=0.516), namely PAI-1, BMI and age (all three positively associated) and VCAM (inversely associated). Consequently, we have carried a second binary logistic regression analysis with the 4 significant explanatory variables as determined in regression #1 and in addition other biomarkers, including TNF- α and CRP. Regression #2 shows that four variables significantly predicted RA, namely VCAM (inversely) and CRP, TNF- α and age (all three positively) ($X^2=107.63$, $df=4$, $p<0.001$;

Nagelkerke=0.788). Using this regression, 94.1% of the cases were correctly classified with a sensitivity of 95.9% and a specificity of 89.5%.

Best predictors of disease activity scores 28.

Table 5 shows the outcome of automatic stepwise regression analyses with DAS28-ESR (regressions #1 and #2) or DAS28-CRP (regressions #3 and #4) as dependent variables and CAM, PAI-1, age, sex, BMI, MetS and use of drugs (regressions #1 and 3) and the same variables but combined with TNF- α and CRP (regressions #2 and #4) as explanatory variables. Regression #1 shows that 36.0% of the variance in DAS28-ESR is explained by PAI-1, BMI and age (all positively associated) and PECAM (inversely associated). Introducing the other biomarkers in the automatic analysis shows a better solution (42.9% of the variance explained) using PAI-1, TNF- α and age (positively) and PECAM (inversely) associated. Regression #3 shows that 34.2% of the variance in DAS28-CRP is explained by PAI-1, BMI and age (all positively associated) and PECAM (inversely associated). Introducing the other biomarkers (regression #4) shows that 49.2% of the variance in the DAS28-CRP is explained by the regression on PAI-1, TNF- α , BMI and age (all positively) and PECAM (inversely). In RA patients there is a strong correlation between DAS28-ESR and DAS28-CRP ($r=0.904$, $p<0.001$, $n=138$).

Discussion

The five adhesion molecules PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin, P-Selectin, and PAI-1 were analyzed to study their associations with RA and disease activity while controlling for the possible effects of MetS. This is important as not only RA-linked inflammatory processes, including the effects of TNF- α , but also inflammatory processes associated with MetS may affect adhesion molecule levels [14, 16, 28, 29].

The main findings of the present study were that RA is accompanied by specific changes in CAM and PAI-1 profile and that the presence of MetS affects CAM and PAI-1 levels in RA patients. Lowered VCAM-1 levels were exclusively associated (inversely) with RA and not with MetS, whilst increased PAI-1 levels were associated with both RA and MetS. On the other hand, increased E-selectin and P-selectin were exclusively associated with MetS and not with RA. Finally, ICAM levels were not associated either with RA or with MetS.

Results on CAM in RA patients have been conflicting. Several studies have shown increased [14, 30, 31], unchanged [12, 21] or decreased [11] VCAM levels in RA patients. Our data are in accordance with Blann`'s et al. [11] who found decreased VCAM levels in RA patients. Wang et al. [14] described that RA patients initially have high VCAM-1 levels and after six months of conventional treatment the VCAM-1 concentration dropped significantly. In the present study, all patients were receiving appropriate treatment for RA, which could in theory have affected VCAM-1 levels. Nevertheless, we found no significant effects of the different treatments including methotrexate, antimalarial drugs and leflunomide on the adhesion molecules. Prednisone significantly elevated PAI-1 levels but not the other CAM. With regard to our negative findings on ICAM levels, previous results obtained by Machold et al [32] also showed negative results, although others authors reported increased levels of ICAM-1 in RA patients [11, 12, 31]. The discrepancies between studies may be explained by different designs as well as differences in disease activity. Important is that we controlled our results for the intervening effects of putative confounders, including MetS.

Some previous studies demonstrated that RA patients have higher levels of PAI-1 than healthy controls [17, 33, 34], while some studies also reported increased PAI-1 in patients with MetS [35, 36, 37, 38, 39, 40]. Our results show that both RA and MetS have independent effects increasing PAI-1 levels. Thus, we found cumulative effects of RA and

MetS on PAI-1 levels whereby RA explains around 11.6% in the variance and MetS explains 6% of the variance in PAI-1. In addition, PAI-1 (positively) and VCAM (inversely) were significantly associated with RA even after considering the effects of BMI or MetS. As the production of PAI-1 is linked to central fat deposition [41], we may suggest that the high prevalence of MetS in RA patients contributes to increased PAI-1 but does not explain the association between RA and PAI-1.

The results of previous studies in RA are also controversial with respect to E-selectin and P-selectin levels [11, 12, 13, 30, 31]. Our data showed no significant alterations in these two CAM when compared to controls, although some previous studies found significant differences [12, 30, 31]. However, we found that both E-selectin and P-selectin are increased in MetS. Since the selectins (E-selectin and P-selectin) were the only CAM elevated in MetS patients, we can assume that the presence of MetS influences the initial stage of the adhesion molecule cascade in patients with RA. We are not aware of any study, to date, which has evaluated these CAM in RA patients controlling for the presence of MetS.

Interestingly, after considering the effects of inflammatory markers (namely CRP and TNF- α) in logistic regression analyses the associations between PAI and RA were no longer significant, whilst the associations between VCAM and PAI were unaffected. This indicates that VCAM together with CRP and TNF- α are the best predictor variables associated with RA. It is known that TNF- α is the main cytokine involved in RA pathophysiology [3, 42] and additionally may contribute to MetS [1]. Inflammatory processes either related to increased TNF- α or MetS may contribute to changes in CAM and PAI-1 [14, 16, 28, 29]. For example, VCAM-1 expression is induced by cytokines, including TNF- α and IL-1 β [43]. Chiu et al. [44] reported that shear stress may decrease VCAM-1 and E-selectin expressions induced by TNF at both mRNA and surface protein levels. Nevertheless, our results show that the association of PAI-1 and RA may be mediated via TNF- α -related

inflammatory processes, whereas the association with VCAM may be ascribed to other processes.

Another major finding of our study is that a large part of the variance in DAS28 values may be explained by PAI-1 and PECAM levels after considering the effects of BMI and increased TNF- α levels. To the best of our knowledge, this is the first study to propose a predictive model of disease activity of RA using PAI-1 or PECAM-1. A first model showed that 36.0% of the variance in DAS28-ESR could be explained by cumulative effects of PAI, PECAM, BMI and age, while the same variables explained 34.2% of the variance in DAS28-CRP. Including TNF- α in these models allowed to predict a larger amount of the variance and shows that the effects of both adhesion molecules are independent from the effects of TNF- α . These results indicate that these two adhesion molecules may have an important role in the pathophysiology of RA activity above and beyond the effects of TNF- α associated process. Various studies have evaluated the influence of adhesion molecules and PAI-1 on the DAS28. Gonzales-Gay et al [20] reported no significant correlation between DAS28-ESR and the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and P-selectin before or after infliximab infusion. On the other hand, Ugur et al [45] reported that ICAM-1 levels were positively correlated with the Ritchie Articular Index Score and CRP, suggesting that ICAM-1 could reflect disease activity. Klimiuk et al [46] found an association between ICAM-1 and VCAM-1 with markers of disease activity, such as ESR and CRP. Klimek et al. [47] reported that E-selectin increased only in patients with high disease activity, while Södergren et al [21] found an association between PAI-1 and DAS28-ESR. Importantly, also BMI contributed significantly and positively to higher DAS28 ESR and DAS28 CRP values. Since increased BMI is associated with MetS [48, 49], the findings described in this study support the notion that MetS influences RA activity. It is important to underline that the predictive models for activity found in the present study cannot replace useful conventional markers of RA.

Actually, changes in CAM and PAI-1 also occur in other inflammatory and BMI-dependent diseases and are therefore not specific.

Some limitations of the current study should be considered. Firstly, the cross-sectional design does not allow causal modeling. Secondly, RA patients were receiving treatment which could have influenced the results. Nevertheless, medications did not have any effect on the CAM. Thirdly, our patients showed moderate disease activity and thus the current results cannot be extrapolated to RA patients with severe activity. However, some strengths of the study also deserve to be mentioned including the simultaneous measurement of five CAM and PAI-1 levels. Furthermore, our study was designed to control for the cumulative effects of RA and MetS independently from other confounders including age, sex and drug status.

In conclusion, our data demonstrated that decreased levels of VCAM-1 are associated with RA diagnosis regardless of the presence of MetS, while increased PAI-1 levels were associated with both RA and MetS and increased selectins (E-selectin and P-selectin) were exclusively associated with MetS and not with RA. We proposed models predicting disease activity based on PECAM-1, PAI-1, TNF- α , age and BMI. These results reinforce the importance of the diagnosis and treatment of the MetS in RA patients, since it can influence the activity of the disease. The present data indicate the need for prospective longitudinal studies to explore the role and utility of CAM in monitoring patients with RA.

Acknowledgements

This study was supported by the National Council of Brazilian Research-CNPq and by Araucária Foundation from the state of Paraná. We thank the University Hospital of State University of Londrina and HUTec Foundation for technical and administrative supports

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Chimenti MS, Triggianese P, Conigliaro P, Candi E, Melino G, Perricone R. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis. *Cell Death Dis* [Internet]. 2015;6(9):e1887. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cddis.2015.246>
2. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365(23): 2205-2219.
3. Angelotti F, Parma A, Cafaro G, Capecchi R, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35: 368-378.
4. Ursini F, Leporini C, Bene F, D'Angelo S, Mauro D, Russo E, et al. Anti-TNF-alpha agents and endothelial function in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):5346. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05759-2>
5. Mojcik, C. F.; Shevach EM. Adhesion Molecules. *Arthritis Rheum.* 1997;40(6):991–1004.
6. Yang X, Chang Y, Wei W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2016;2016:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2016/6813016/>
7. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425–434.
8. Wai Wong C, Dye DE, Coombe DR. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Int J Cell Biol.* 2012;2012.

9. Prasad M, Hermann J, Gabriel SE, Weyand CM, Mulvagh S, Mankad R, et al. Cardiorheumatology: cardiac involvement in systemic rheumatic disease. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(3):168–76.
10. Bartoloni E, Shoenfeld Y, Gerli R. Inflammatory and autoimmune mechanisms in the induction of atherosclerotic damage in systemic rheumatic diseases: Two faces of the same coin. *Arthritis Care Res.* 2011;63(2):178–83.
11. Blann AD, Herrick A, Jayson MI. Altered levels of soluble adhesion molecules in rheumatoid arthritis, vasculitis and systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* [Internet]. 1995;34(9):814–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7582719
12. Veale DJ, Maple C, Kirk G, McLaren M, Belch JJ. Soluble cell adhesion molecules--P-selectin and ICAM-1, and disease activity in patients receiving sulphasalazine for active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1998;27(0300–9742 (Print)):296–9.
13. Ateş A, Kinikli G, Turgay M, Duman M. Serum-Soluble Selectin Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2004;23(5):421–5.
14. Wang L, Ding Y, Guo X, Zhao Q. Role and mechanism of vascular cell adhesion molecule-1 in the development of rheumatoid arthritis. *Exp Ther Med.* 2015;10:1229–33.
15. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9468):1415–28.
16. Zambon A, Pauletto P, Crepaldi G. Review article: the metabolic syndrome--a chronic cardiovascular inflammatory condition. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22 Suppl 2:20–3.

17. Schram MT, Stehouwer. Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res.* 2005; 37(1):49-55.
18. Kamper EF, Kopeikina LT, Trontzas F, Potamianou A, Tsakiroglou E, Stavridis JC. The effect of disease activity related cytokines on the fibrinolytic potential and cICAM-1 expression in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000;27(11):2545-50.
19. Medcalf RL. Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system. *J Thromb Haemost.* 2007;5(SUPPL. 1):132–42.
20. Gonzales-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, De Matias JM, Gonzales-Juanatey C, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A et al. Influence of anti-TNF- α infliximab therapy on adhesion molecules associated with atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, July 2006, 24(4):373-9.
21. Södergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundström E, Smedby T, et al. Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2010;12(4):R158. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar3116>
22. da Cunha V, Brenol C, Brenol J, Fuchs S, Arlindo E, Melo I, et al. Metabolic syndrome prevalence is increased in rheumatoid arthritis patients and is associated with disease activity. *Scand J Rheumatol* [Internet]. 2012;41(3):186–91. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03009742.2011.626443>
23. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1580-8. Doi:10.1136/ard.2010.138461.

24. Prevoo MLL, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LBA, van Riel PLCM. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. *Arthritis Rheum.* 1995, 38(1):44:48.
25. Fransen J, Welsing P, Keijzer Rd, Riel Pv. Disease Activity Scores using C-reactive protein: CRP may replace ESR in the assessment of RA disease activity. *Ann Rheum Dis.* 2004; 62:151.
26. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation.* 2005;112(17):2735–52.
27. Benjamini Y, Hochberg Y. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B [Internet].* 1995;57(1):289–300. Available from:
http://www.stat.purdue.edu/~doerge/BIOINFORM.D/FALL06/Benjamini_and_Y_FDR.pdf
http://engr.case.edu/ray_soumya/mlrg/controlling_fdr_benjamini95.pdf
28. Volin, MV. Soluble Adhesion Molecules in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Curr Pharm Des.* 2005;11:633-653.
29. Gómez Rosso L, Benítez MB, Fornari MC, Berardi V, Lynch S, Schreier L, et al. Alterations in cell adhesion molecules and other biomarkers of cardiovascular disease in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2008;199(2):415–23.
30. Kolopp-Sarda MN, Guillemin F, Chary-Valckenaere I, Béné MC, Pourel J, Faure GC. Longitudinal study of rheumatoid arthritis patients discloses sustained elevated serum levels of soluble CD106 (V-CAM). *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19(2):165–70.
31. Littler AJ, Buckley CD, Wordworth P, Collins I, Martinson J, Simmons DL. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-

- selectin and P-selectin). in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1997 Feb;36(2):164-9.
32. Machold, Klaus P.; Kiener HP. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 in Patients With Rheumatoid Arthritis And Systemic Lupus Erythematosus. Vol. 68, *Clinical Immunology And Immunopathology*. 1993. p. 74–8.
33. Kopeikina LT, Kamper EF, Koutsoukos V, Bassiacos Y, Stavridis I. Imbalance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and its specific inhibitor (PAI-1) in patients with rheumatoid arthritis associated with disease activity. *Clin Rheumatol*. 1997;16(3):254-60.
34. Wallberg-Jonsson S, Cvetkovic JT, Sundqvist KG, Lefvert K, Rantapää-Dahlqvist S. J. Activation of the immune system and inflammatory activity in relation to markers of atherothrombotic disease and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol*;2002;29(5):875-882.
35. Mertens I, Verrijken A, Michiels JJ, Van der Planken M, Ruige JB, Van Gaal LF. Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *Int J Obes [Internet]*. 2006;30(8):1308–14. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ijo.0803189>.
36. Chou YY, Sheu WHH, Tang YJ, Chen YM, Liao SC, Chuang YW, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) is a valuable biomarker for predicting the metabolic syndrome (MS) in institutionalized elderly residents in Taiwan. *Arch Gerontol Geriatr [Internet]*. 2009;49(SUPPL.2):S41–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4943\(09\)70012-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4943(09)70012-3).
37. Coffey CS, Asselbergs FW, Hebert PR, Hillege HL, Li Q, Moore JH, et al. The Association of the Metabolic Syndrome with PAI-1 and t-PA Levels. *Cardiol Res*

- Pract [Internet]. 2011;2011:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/crp/2011/541467/>
38. Bilgili S, Celebiler AC, Dogan A, Karaca B. Inverse relationship between adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 in metabolic syndrome patients. *Endocr regul.* 2008;42:63-8.
39. Ahirwar AK, Jain A, Singh A, Goswami B, Bhatnagar MK, Bhattacharjee J. The study of markers of endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015;24(3):131–6.
40. Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JJ, Sodhi K. Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: A panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population. *Int J Med Sci.* 2016;13(1):25–38.
41. Alesi MC; Juhan-Vague I. PAI-1 and the Metabolic Syndrome Links, Causes, and Consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2200-2207.
42. Costa NT, Veiga Iriyoda TM, Kallaur AP, Delongui F, Alfieri DF, Lozovoy MAB, et al. Influence of Insulin Resistance and TNF- α on the Inflammatory Process, Oxidative Stress, and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016;2016(Das 28):1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/8962763/>
43. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2011;15(6):1607–38. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3522>
44. Chiu JJ, Lee PL, Chen CN, Lee CI, Chang SF, Chen LJ, et al. Shear Stress Increases ICAM-1 and Decreases VCAM-1 and E-selectin Expressions Induced by Tumor

- Necrosis Factor- α in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(1):73–9.
45. Ugur M, Yildirim K, Kiziltunc A, Erdal A, Karatay S, Senel K. Correlation between soluble intercellular adhesion molecule 1 level and extracellular superoxide dismutase activity in rheumatoid arthritis: A possible association with disease activity. *Scand J Rheumatol.* 2004;33(4):239–43.
46. Klimiuk P a, Sierakowski S, Latosiewicz R, Cylwik JP, Cylwik B, Skowronski J, et al. Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with distinct variants of rheumatoid synovitis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(9):804–9.
47. Klimek E, Skalska A, Kwaśny-Krochin B, Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, et al. Differential associations of inflammatory and endothelial biomarkers with disease activity in rheumatoid arthritis of short duration. *Mediators Inflamm.* 2014;2014.
48. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014;2014.
49. Han TS, Lean ME. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc Dis* [Internet]. 2016;5:204800401663337. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2048004016633371>

Table 1. Socio-demographic and biomarkers data in patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy controls

Variables	Controls (n = 115)	RA (n = 144)	F/x²	Df	P
Age (years)	46.8 (9.3)	51.2 (13.1)	9.07	1/256	0.003
Sex (F/M)	93/22	126/18	2.15	1	0.142
Caucasian/not Caucasian	95/20	99/45	7.05	-	0.016
BMI (kg/m ²)	25.1 (3.6)	28.0 (5.7)	20.94	1/250	<0.001
Waist Circumference (cm)	91.3 (11.2)	93.9 (13.6)	2.63	1/248	0.106
MetS (Y/N)	25/90	41/103	2.17	1	0.275
Smoking (Y/N)	10/105	26/118	5.38	1	0.02
Antihypertensive drugs(Y/N)	22/93	49/95	10.84	1	0.011
TNF- α *(pg/mL)	9.65 (38.4)	58.1 (126.5)	89.29	1/153	<0.001
CRP* (mg/L)	2.6 (3.7)	11.2 (11.2)	48.96	1/248	<0.001
DAS28-ESR	-	3.6 (1.5)	-	-	
DAS28-CRP	-	3.3 (1.4)	-	-	
RF (U/mL)	-	118.6 (72.1)	-	-	
Anti-CCP (U/mL)	-	210.7 (700.2)	-	-	

All data are shown as mean (SD). *Those data are processed in Ln transformation. BMI: body mass index; MetS: metabolic syndrome; FR: rheumatoid factor; anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; CRP: C-reactive protein.

Table 2. Results of multivariable General Linear Model (GLM) analysis with 6 adhesion molecules as dependent variables.

Tests	Dependent variables	Explanatory variables	F	df	p	Partial Eta Squared
Multivariate	All 5 adhesion molecules and PAI	RA	5.79	6/149	<0.001	0.189
		Sex	1.33	6/149	0.248	0.051
		MetS	3.46	6/149	0.003	0.122
		Age	1.57	6/149	0.161	0.059
Between-subject effects	PAI	RA	20.20	1/154	<0.001	0.116
		MetS	9.91	1/154	0.002	0.060
	VCAM	RA	7.45	1/154	0.007	0.046
	E-selectin	MetS	12.87	1/154	<0.001	0.077
	P-selectin	MetS	4.31	1/154	0.039	0.027

RA, rheumatoid arthritis; MetS, metabolic syndrome; PAI, plasminogen activator inhibitor; VCAM, Vascular cell adhesion protein.

Table 3. Model-generated estimated marginal means (SE) of the adhesion molecules and PAI-1 in rheumatoid arthritis (RA) and metabolic syndrome (MetS).

	Controls (n=43)	RA (n=118)	MetS (n=37)	No MetS (n=124)
PAI I (pg/mL)	44.322 (10.506)	76.788 (6.887)*	71.824 (10.009)**	49.285 (7.218)
PECAM I (pg/mL)	25.366 (1709)	24.686 (1.120)	26.381 (1.628)	23.672 (1.174)
ICAM (pg/mL)	476.800 (205.710)	423.646 (134.855)	507.075 (195.972)	393.371 (141.343)
VCAM (pg/mL)	712.713 (52.184)	624.283 (34.209)*	700.818 (49.714)	636.176 (35.855)
E-selectin (pg/mL)	110.997 (14.687)	123.082 (9.628)	141.005 (13.991)**	93.074 (10.091)
P-selectin (pg/mL)	96.575 (12.565)	108.543 (8.237)	111.008 (11.970)**	94.110 (8.633)

* Significantly different from normal controls

** Significantly different from subjects without MetS

PAI, plasminogen activator inhibitor; PECAM I, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; ICAM, intercellular adhesion molecule 1; VCAM, vascular cell adhesion protein.

Table 4. Results of automatic stepwise binary regression analysis with Rheumatoid Arthritis (RA) as dependent variable.

Regressions	Explanatory variables	Wald	Df	P	OR	% 95 CI
Regression \neq 1	PAI	10.62	1	0.001	2.31	1.40 -3.83
	VCAM	5.43	1	0.020	0.57	0.37-0.92
	BMI	5.70	1	0.017	1.14	1.02-1.27
	Age	23.11	1	<0.001	1.12	1.07-1.17
Regression \neq 2	VCAM	9.76	1	0.002	0.34	0.17-0.67
	CRP	8.62	1	0.003	4.36	1.63-11.63
	TNF α	18.19	1	<0.001	10.62	3.59-31.46
	Age	16.34	1	<0.001	1.21	1.10-1.32

PAI, plasminogen activator inhibitor; VCAM, vascular cell adhesion protein; BMI, body mass index; TNF- α , tumor necrosis factor α ; CRP, C-reactive protein., OR: Odds ratio; 95%; CI: 95% confidence interval with lower and upper limit.

Table 5. Results of automatic stepwise multiple regression analysis with DAS28 ESR and DAS28 CRP as dependent variables.

Dependent Variables	Explanatory Variables	T	p	F_{model}	Df	P	R² (%)
DAS28 ESR (≠ 1)	PAI	+4.78	<0.001	21.68	4/154	<0.001	36.0 %
	PECAM	- 2.76	0.006				
	BMI	+3.45	0.001				
	Age	+5.53	<0.001				
DAS28 ESR (≠ 2)	PAI	+3.45	<0.001	24.98	4/133	<0.001	42.9 %
	TNF α	+7.40	<0.001				
	BMI	+2.50	0.014				
	PECAM I	- 2.36	0.020				
DAS28 CRP (≠3)	PAI	+4.72	<0.001	19.79	4/152	<0.001	34.2 %
	PECAM I	- 3.15	0.002				
	BMI	+3.52	0.001				
	Age	+4.85	<0.001				
DAS28 CRP (≠ 4)	PAI	+4.15	<0.001	25.41	5/131	<0.001	49.2 %
	TNF α	+6.29	<0.001				
	PECAM I	- 2.92	0.004				
	BMI	+2.39	0.018				
	Age	+2.96	0.004				

Regressions ≠ 1 and 3: explanatory variables are adhesion molecules, age, sex, body mass index (BMI), metabolic syndrome, and use of drugs

Regression ≠ 2 and 4: same explanatory variables as regression ≠ 1 and in addition tumor necrosis factor (TNF)- α

PAI, plasminogen activator inhibitor; PECAM I, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; BMI, body mass index; TNF α , tumor necrosis factor- α ; CRP, C-reactive protein.

7.0. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse estudo indicam que níveis reduzidos de VCAM-1 estão associados com o diagnóstico de AR independentemente da presença da SM, enquanto níveis elevados de PAI-1 estão associados tanto com a AR quanto com a SM. Já os níveis de E-selectina e de P-selectina se associaram apenas à SM. Foi proposto um modelo diagnóstico para AR, baseado nos parâmetros VCAM-1, PCR, TNF- α e idade, com sensibilidade de 95,9% e especificidade de 89,5%. Também foram elaborados modelos preditores para a atividade da doença baseados nos níveis de PECAM-1, PAI-1, TNF- α , IMC e idade. Foi possível associar esses modelos como responsáveis por até 49,2% da variação no DAS28-PCR e por 42,9% da variação no DAS28-VHS. Os resultados apresentados reforçam a importância do diagnóstico da SM em pacientes com AR, uma vez que a presença da SM pode afetar a atividade da AR.

8.0 REFERENCIAS

- ALESSI, M. C.; JUHAN-VAGUE, I. PAI-1 and the metabolic syndrome: Links, causes, and consequences. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 10, p. 2200-2207, 2006.
- ALETAHA D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis** v. 69, p. 1580-1588, 2010. Doi: 10.1136/ard.2010.138461.
- ALLAIRE, S. et al. Contemporary prevalence and incidence of work disability associated with rheumatoid arthritis in the US. **Arthritis Rheum**, v. 59, p. 474-480, 2008.
- AMARO, I. F. et al. Metabolic Syndrome in Rheumatoid Arthritis. **Mediators Inflamm**, v. 2013, Article ID 710928, 11 pages. <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/710928>>
- ARUL, R., KUMAR, P.P. Study Of Hematological Profile In Rheumatoid Arthritis Patients. **Journal of Dental and Medical Sciences**. v. 15, n. 9 , p. 96-100, 2016.
- BARCLAY, A. N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains – a máster superfamily of interaction molecules. **Seminars in Immunology**, v. 15, p. 215-223, 2003.
- BENJAMINI, Y. et al. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Stat Soc B**, v. 57, p. 289-300, 1995.
- BEVILACQUA, M. P. et al. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. **Proc Natl Acad Sci** , v. 84, p. 9238-9242, 1987.
- BUTCHER, E. C. Leukocyte–endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, v. 67, p. 1033–1036, 1991.
- CHEN J., WU Y. Understanding the Functional Roles of Multiple Extracellular Domains in Cell Adhesion Molecules with a Coarse-Grained Model. **J Mol Biol** v. 9, p. 1081-1095, 2017. doi: 10.1016/j.jmb.2017.02.013.
- CHEN, X.; GUMBINER, B. M. Crosstalk between diferente adhesion molecules. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, p. 572-578, 2006.
- CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v3_v11, n. 51, 2012.
- CIMMINO, M. A.; SALVARANI, C.; MACCHIONE, P. Extra-articular manifestations in 587 Italian patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**. v. 19, p. 213-217, 2000.

- COJOCARU M. et al. Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. **A Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n.4, p. 286-291, 2010.
- CORNIER, M. A. et al. The metabolic syndrome. **Endocr Ver**, v. 29, n. 7, p. 777–822, 2008.
- DA CUNHA V. R. et al. Metabolic syndrome prevalence is increased in rheumatoid arthritis patients and is associated with disease activity. **Scand J Rheumatol**, v. 41, p. 186-191, 2012.
- DAVIDSON, S. M. Endothelial mitochondria and heart disease. **Cardiovasc Res**, v. 88, p. 58-66, 2010.
- DUSTIN, M. L. et al. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J Immunol**, v. 137, p. 245-254, 1986.
- Eckel R. H. ; Grundy S. M.; Zimmet P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**. v. 365, p. 1415-1428, 2005.
- ELKAN A. C. et al. Rheumatoid cachexia is associated with dyslipidemia and low levels of atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine but not with dietary fat in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. **Arthritis Res Ther**, v.11, n.2, articleR37, 2009.
- FRANSEN J et al. Disease Activity Scores using C-reactive protein: CRP may replace ESR in the assessment of RA disease activity. **Ann Rheum Dis**, v. 62, p. 151, 2004.
- FREEMONT, A. J.; HOYLAND, J. A. Cell adhesion molecules. **J Clin Pathol: Mol Pathol** , v. 49, p. M321-M330, 1996.
- GABRIEL, S. E.; MICHAUD, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. **Arthritis Res Ther**, v.11, n.3, 2009.
- GAVRILĂ, B. I.; CIOFU, C.; STOICA, V. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis, what is new? **J Med Life**, v. 9, n. 2, p. 144-148, 2016.
- GEARING, A. J. H.; NEWMAN, W. Circulating adhesion molecules in tuberculosis. **Immunology Today**, v. 14, n. 10, p. 506–512, 1993.
- GENG, J. G. et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. **Nature**, v. 343, p. 757-760, 1990.
- GHOSH, A. K.; VAUGHAN, D. E. PAI-1 in tissue fibrosis. **J Cell Physiol**. V. 227, n.2, p. 493-507, 2012.

- GIANNOTTI, G.; LANDMESSER, U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. **Herz**, v. 32, p. 568-572, 2007.
- GIBOFISKY, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. **Am J Manag Care**, v. 18, p. S295–302, 2012.
- GOLIAS, C. et al. Physiology and Pathophysiology of Selectins, Integrins, and IgSF Cell Adhesion Molecules Focusing On Inflammation. A Paradigm Model on Infectious Endocarditis. **Cell Communication & Adhesion**, v. 18, p. 19-32, 2011.
- GREMESE, E., FERRACCIOLI, G. The metabolic syndrome: The crossroads between rheumatoid arthritis and cardiovascular risk. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 10, p. 582–589, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2011.04.018>.
- GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2735-2752, 2005.
- GUMBINER, B. M. Cell Adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v. 9, n. 3, p. 245-257, 1996.
- HARINGMAN, J. J.; OOSTENDORP, R. L.; TAK, P. P. Targeting cellular adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 10, n. 2, p.299-310, 2005.
- HATTORI, R. et al. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. **J Biol Chem**, v. 264, p. 7768-7771, 1989.
- HIRATA, T. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications A novel splice variant of human L-selectin encodes a soluble molecule that is elevated in serum of patients with rheumatic diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, p. 371-377, 2015.
- HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 6, p. 265-278, 2004.
- <http://www.stat.purdue.edu/~doerge/BIOINFORM.D/FALL06/Benjamini> and [Y](http://www.stat.purdue.edu/~doerge/BIOINFORM.D/FALL06/Benjamini)
[FDR.pdf](http://www.stat.purdue.edu/~doerge/BIOINFORM.D/FALL06/Benjamini)http://engr.case.edu/ray_soumya/mlrg/controlling_fdr_benjamini95.pdf.

- HUANG, M. T. et al. ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence of stimulus specificity and a role in PECAM-1 & independent transmigration. **BLOOD**, v. 107, p. 4721e4727, 2006.
- HUIZINGA, T. W. et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. **Arthritis Rheum**, v 52, p. 3433–3438, 2005. doi: 10.1002/art.21385.
- HUMBRIA, A. et al. Expression of L-selectin, CD43, and CD44 in synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint diseases: evidence for a soluble form of L-selectin in synovial fluid. **Arthritis Rheum**, v. 37, p. 342-348, 1994.
- HWANG, D.; KIM, W. U. Modelling cytokine signalling networks. **Nature Reviews Rheumatology**. doi: <10.1038/nrrheum.2016.194>. Published online 1 Dec 2016.
- ICARDI, A. et al. Kidney involvement in rheumatoid arthritis. **Reumatismo**, v. 55, n. 2, p. 76-85, 2003.
- INOUE E et al. Comparison of Disease Activity Score (DAS)28-erythrocyte sedimentation rate and DAS28-C-reactive protein threshold values. **Ann Rheum Dis**, v. 66, p. 407-409, 2007.
- ISAACS, J. D. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? **Nature Reviews | Immunology**. vol. 10, p 605-611, 2010.
- JONGBLOED, S. L. et al. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 8, R15, 2006.
- KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 1, p. 49–62, 2015. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrrheum.2015.169>.
- KARVOUNARIS, S. A. et al. Metabolic syndrome is common among middle-to-older-age Mediterranean patients with rheumatoid arthritis and correlates with disease activity: a retrospective, cross-sectional, controlled study. **Ann Rheum Dis**, v. 66, p. 28-33, 2007.
- KAUR J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiol Res Pract**, 2014.
- KEMPE, S. et al. NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 16, p. 5308–5319, 2005.

KEREKES, G. et al. Rheumatoid arthritis and metabolic syndrome. **Nat Rev Rheumatol**. V. 10, n. 11, p. 691-696, 2014. <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrrheum.2014.121>>.

KIM, K et al. STAT3 activation in endothelial cells is importante for tumor metastasis via increased cell adhesion molecule expression. **Oncogene**, 2017. doi: <10.1038/onc.2017.148>.

KLARESKOG, L et al. A New Model for an Etiology of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism** Vol. 54, No. 1, January 2006, pp 38–46.

KLARESKOG, L. et al.. Mechanisms of disease: genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 2, p. 425-433, 2006.

KLARESKOG, L.; CATRINA, A. I.; PAGET, S. Rheumatoid arthritis. **Lancet** v. 373, p. 659–672, 2009.

KLEIN, R. M. et al. Circulating adhesion molecules (cICAM-1, cVCAM-1) in patients with suspected inflammatory heart muscle disease. **Z Kardiol**, v. 87, n. 2, p. 84-93, 1998.

KLIMEK, et al. Differential Associations of Inflammatory and Endothelial Biomarkers with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis of Short Duration. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, article id 681635, 11 pages.

KLIMIUK, P. A. et al. Soluble cell adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and E-selectin) in patients with early rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 36, p. 345-350, 2007.

KOPEIKINA, L. T. et al. Imbalance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and its specific inhibitor (PAI-1) in patients whit rheumatoid arthritis associated with disease activity. **Clinical Rheumatology**, v. 16, n. 3, p. 254-260, 1997.

KU, I. A. et al. Rheumatoid arthritis: a model of systemic inflammation driving atherosclerosis. **Circulation Journal**, v. 73, n. 6, p. 977-985, 2009.

LESLIE, B. R. Metabolic Syndrome: Historical Perspectives. **Am J Med Sci**, v. 330, n. 6, p. 264–268, 2005. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002962915328755>.

LEWIS, M.; D'CRUZ, D. Adhesion molecules, mycophenolate mofetil and systemic lúpus erythematosus. **Lupus**, v. 14, p. s17-s26, 2005.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.

Nature, v. 7, p. 678-689, 2007.

LINJEN, H. R. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 1, p. 35-45, 2005.

LO, S. K. et al. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha and beta 2) on human neutrophils. **J Exp Med**, v. 173, p. 1493-1500, 1991.

LUSIS, A.J.; ATTIE, A. D.; REUE, K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. **Nat Rev Genet**, v. 9, n.11, p. 819–30, 2008. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg2468>.

MANARA, M.; SINIGAGLIA, L. Bone and TNF in rheumatoid arthritis: clinical implications. **RMD Open**, v. 1, 2015. <http://rmdopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/rmdopen-2015-000065>.

MARADIT-KREMERS, H. et al. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study, **Arthritis and Rheumatism**, vol. 52, n. 2, p. 402–411, 2005.

MARIGLIANO, B. et al. Lung involvement in connective tissue diseases: a comprehensive review and a focus on rheumatoid arthritis. **Autoimmun Ver**, v. 12, p. 1076–1084, 2013.

MCEVER, R. P. Selectins: Initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovasc Res**, v. 107, n. 3, p. 331-339, 2015.

MCGARY, E. C.; LEV, D. C.; BAR-ELI, M. Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma. **Câncer Biology & Therapy**, v. 1, n. 5, p. 454-465, 2002.

MCINNES, I. B.; SCHETT. G. Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **The new england journal of medicine**, v. 23, p. 2205-2219, 2011.

MEDEIROS et al. Correlation of rheumatoid arthritis activity indexes (Disease Activity Score 28 measured with ESR and CRP, Simplified Disease Activity Index and Clinical Disease Activity Index) and agreement of disease activity states with various cut-off points in a Northeastern Brazilian population. **Rev Bras Reumatol**, v.55, n. 6, p. 477-484, 2015.

MERONI, P-L., VALESINI, G. Tumour Necrosis Factor α Antagonists in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: An Immunological Perspective. **BioDrugs**, v. 28, p. 5–13, 2014. <http://link.springer.com/10.1007/s40259-013-0063-0>.

- MIHALY, S. R.; NINOMIYA-TSUJI, J.; MORIOKA, S. TAK1 control of cell death. **Cell Death Differ**, v. 21, p. 1667–1676, 2014.
- MULLER, W. A. Migration of Leukocytes Across the Vascular Intima. **Trends Cardiovasc Med**, v. 5, p. 15-20, 1995.
- NEWMAN, P. J. The biology of PECAM-1. **J Clin Invest**, v. 99, p. 3-8, 1997.
- NIELEN, M. M. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis Rheum**, v. 50, p. 380–386, 2004.
- PAN, L. et al. Research advances on structure and biological functions of integrins Background. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1094, p. 1-11, 2016.
- PATEL, K.D. et al. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophil. **J Cell Biol**, v. 112, p. 749-759, 1991.
- PETRI, B., PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. **J Immunol**, v. 180, p. 6439–6446, 2008.
- PIALI, L. et al. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. **J Cell Biol**, v. 130, p. 451-460, 1995.
- PICKERING, T. G. et al. American Heart Association Council on High Blood Pressure Research Professionals From the Subcommittee of Professional and Public Education of the Animals: Part 2: Blood Pressure Measurement in Experimental Animals: A Statement for Recommendations for Blo. **Circulation**, v. 111, n. December 2004, p. 697–716, 2005.
- PREVOO, M. L. L. et al. Modified disease activity scores that include twenty- eight- joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 38, n. 1, p. 44-48, 1995.
- PRIVRATSKY, J. R.; NEWMAN, D. K.; NEWMAN, P. J. PECAM-1: Conflicts of Interest in Inflammation. **Life Sci**, v. 87, n. 3-4, p. 69-82, 2010.
- PRUJIN, G. J.; WIJK, A.; van VENROOJI, W. J. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 12, 203, 2010.
- RANTAPAA-DAHLQVIST, S. et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 48, p. 2741–2749, 2003.

- RAO, R. M. et al. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. **Circulation Research**, v. 101, n. 3, p. 234-247, 2007.
- RIDKER, M. et al. C-reactive protein and others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 12, p. 836-843, 2000.
- ROUBENOFF R. Rheumatoid cachexia: a complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n.2, article108, 2009.
- SCHRAM, M. T.; STEHOUWER, C. D. A. Endothelial Dysfunction, Cellular Adhesion Molecules and the Metabolic Syndrome. **Horm Metab Res**, v.37, p.49-55, 2005.
- SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 376, p. 1094–1108, 2010. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60826-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60826-4).
- SKEOCH, S. et al. Cell Adhesion molecules as potential biomarkers of nephritis, damage and accelerated atherosclerosis in patients with SLE. **Lupus**, v. 23, p. 819-824, 2014.
- SMITH, M. D. et al. Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression. **Rheumatology**, v. 40, p. 965-977, 2001.
- SMOLEN, J. S. et al. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 370, p. 1861-1874, 2007.
- SPASOVSKI, D. et al. Determination of the diagnostic values of asymmetric dimethylarginine as na indicator for evaluation of the endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis**, v. 2013, article id 818037, 10 pages, 2013.
- SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, n. 2, p. 425-434, 1990.
- SRIKANTHAN, K. et al. Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: A panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population. **Int J Med Sci**, v. 13, n. 1, p. 25–38. 2016.
- STAMP, L. et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, p. 1796-1803, 2012.

- SURDACKI, A. et al. Elevated plasma asymmetric dimethyl-L-arginine levels are linked to endothelial progenitor cell depletion and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, vol. 56, n.3, p. 809–819, 2007.
- TEDDER, T. F. et al. The selectins : L-Selectin. **The Faseb Journal**, v. 9, p. 866–873, 1995.
- TELEN, M. J. Cellular adhesion and the endothelium: E-selectin, L-selectin, and pan-selectin inhibitors. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 28, n.2, p. 341-354, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2013.11.010>.
- URSINI, F. et al. Anti-TNF-alpha agents and endothelial function in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 5346, 2017. <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05759-2>.
- VAN DER HEIJDE D. M. F. M. et al. A comparison of validity of single variables and composed indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 51, p. 177-181, 1992.
- VAN DER HEIJDE DMFM et al. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. **Ann Rheum Dis**, v.49, p. 916-920, 1990.
- VAN HINSBERG, V. W. M. et al. Characterization and fibrinolytic properties of human mental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. **Blood**, v. 75, p. 1490-1497, 1990.
- VAN HINSBERG, V. W. M. et al. Tumour necrosis factor induces the production of urokinases-type plasminogen activator by human endothelial cells. **Blood**, v. 75, p. 1991-1998, 1990.
- VOLIN, M. V. Soluble Adhesion Molecules in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 633-653, 2005.
- WANG, L. et al. Role and mechanism of vascular cell adhesion molecule-1 in the development of rheumatoid arthritis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 10, p. 1229-1233, 2015.
- WEYAND, C. M. et al. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 6, n. 117, p. 801-6, 1992.

Xu Z, Jin B. A novel interface consisting of homologous immunoglobulin superfamily members with multiple functions. **Cell Mol Immunol**, v. 7, n. 1, p. 11-19, 2010. <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2009.108>.

YANG, X.; CHANG, Y.; WIE, W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, article id 6813016.

ZAMBON, A.; PAULETTO, P.; CREPAUDI, G. Review article: the metabolic syndrome – a chronic cardiovascular inflammatory condition. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 22 Suppl.2, p. 20–23, 2005.

ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunology Today**, v. 13, n. 3, p. 93-100, 1992.

9.0 ANEXOS E APÊNDICES

Anexo A. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos 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

CEP: 86.038-440

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

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

CEP: 86.038-440

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

E-mail: cep268@uel.br

Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido.**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 participar da pesquisa **“Avaliação do estresse oxidativo, fatores de risco cardiovasculares e frequência de síndrome metabólica em pacientes com artrite reumatoide”** realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU), da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é “identificar os fatores de risco cardiovasculares em pacientes com artrite reumatoide (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 totalmente 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 reumatoide, 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 Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. 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 da mesma.

(assinatura do membro da equipe que apresentou o TCLE)

Pesquisadores responsáveis

Prof. Dra. Andréa Name Colado Simão

Prof. Dr. Isaías Dichi

Apêndice B. Ficha de avaliação dos pacientes com Artrite Reumatoide.**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 DIAGNÓTICO: _____

DAS28: 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 ²)	Circunferência abdominal (cm)	Pressão arterial (mmHg)