



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

MARIA HELENA Q. DE ARAÚJO MARIANO

**ARTRITE REUMATÓIDE: AVALIAÇÃO DE CITOCINAS (IL-6 e IL-10), DA
FREQUÊNCIA DA IgG DO PARVOVÍRUS B19 E DESENVOLVIMENTO DE UM
BIOSSENSOR PARA ANTI- PEPTÍDEO CITRULINADO CÍCLICO (ACCP).**

**Recife
2014**

MARIA HELENA Q. DE ARAÚJO MARIANO

**ARTRITE REUMATÓIDE: AVALIAÇÃO DE CITOCINAS (IL-6 e IL-10), DA
FREQUÊNCIA DA IgG DO PARVOVÍRUS B19 E DESENVOLVIMENTO DE UM
BIOSENSOR PARA ANTI- PEPTÍDEO CITRULINADO CÍCLICO (ACCP).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Sob orientação de Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra e Co- Orientadora: Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**Recife
2014**

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Mariano, Maria Helena Q. de Araújo

Artrite reumatóide: avaliação de citocinas (IL-6e IL-10) da frequência da IgG do parvovírus B19 e desenvolvimento de um biossensor para anti-peptídeo citrulinado cíclico (ACCP)./ Maria Helena Q. de Araújo Mariano– Recife: O Autor, 2014.

110 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Rosa Amália Fireman Dutra

Coorientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Côelho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2014.

Inclui bibliografia

1. Artrite reumatóide 2. Citocinas 3. Biotecnologia I. Dutra, Rosa Amália Fireman (orientadora) II. Côelho, Maria Rosângela Cunha Duarte (coorientadora) III. Título

616.7227

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-190

MARIA HELENA Q. DE ARAÚJO MARIANO

**ARTRITE REUMATÓIDE: AVALIAÇÃO DE CITOCINAS (IL-6 e IL-10), DA
FREQUÊNCIA DA IGG DO PARVOVÍRUS B19 E DESENVOLVIMENTO DE UM
BIOSENSOR PARA ANTI- PEPTÍDEO CITRULINADO CÍCLICO (ACCP).**

Aprovada em: 26 de maio de 2014

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra (Orientadora) - UFPE

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva - UFPE

Prof^a. Dr^a. Maria de Mascena Diniz Maia - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Marli Tenório Cordeiro- CPqAM-Fiocruz-PE

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva - UFPE

**Recife
2014**

A todos os pacientes com doenças reumatológicas, sofredores, cheios de uma esperança contagiante mesmo convivendo com tantas precariedades e enfrentando tantas vicissitudes. O meu carinho e respeito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **DEUS** minha Força, meu Ajudador por ter conseguido realizar este trabalho.

Minha especial gratidão a minha família: Hertz, Juliana e Daniel. Meus pais William e Benigna (*in memoriam*), Titia Helena e meu irmão Antonio. Todos de forma incondicional estiveram ao meu lado me dando amor, atenção enfim me agradando diariamente ao longo de minha vida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rosa Dutra, por toda paciência, oportunidade e ensinamentos ao longo dessa caminhada.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Rosângela Coêlho pelo acolhimento, ensinamentos e contribuição para finalização deste trabalho.

Ao meu amigo e colega de Reumatologia, Prof. Eliézer Rushansky, por toda a atenção, ajuda e generosidade em compartilhar comigo sua experiência e os seus pacientes na participação deste estudo.

Ao Prof. Samuel Kosminsky pela disponibilidade e presteza demonstrada para comigo.

A Georgea Cahú do Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela ajuda, profissionalismo e companheirismo.

A todos os pacientes que participaram das coletas de forma voluntária os quais demonstraram por mim um carinho incomensurável e grande espírito colaborativo.

Aos queridos amigos, que tive a oportunidade de conhecer durante este período, os quais me ajudaram, me apoiaram e disponibilizaram seu precioso tempo em meu favor.

A todos do Laboratório de Engenharia Biomédica - LEB (UFPE), e Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO que contribuíram para a minha formação.

RESUMO

A artrite reumatóide (AR), é uma doença crônica inflamatória, em cuja etiologia estão envolvidos fatores genéticos, ambientais e infecções. Dentre as infecções se destacam as virais cujas proteínas modificam a função dos sinoviócitos como ocorre com o Parvovírus B19 (PVB19). Estudos tem mostrado a participação das citocinas IL-6 e L-10 na fisiopatogenia da AR. O diagnóstico da AR se baseia em critérios clínicos, radiológicos e laboratoriais. Dentre os auto- anticorpos, o fator reumatóide (FR) apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade. Por lado, o anticorpo antiptéido citrulinado cíclico (ACCP) é um importante marcador para o diagnóstico e tem valor preditivo de um pior prognóstico. Sua detecção pelo ELISA, têm mostrado excelente desempenho diagnóstico, embora seja oneroso e mais demorado. Visando diagnósticos mais rápidos e práticos, os biossensores são ideais para testes tipo “*point-of-care*” devido à sua portabilidade. Os objetivos desta tese foram: avaliar a correlação dos níveis séricos de IL-10, IL-6 e a frequência do anti-IgG PVB19 com atividade clínica da AR mediante os índices compostos de atividade de doença (ICADs). em diferentes tratamentos e desenvolver um imunossensor eletroquímico *label free* para ACCP. Foi desenvolvido um estudo transversal para estimar a frequência de anti-IgG PVB19 e determinar os níveis séricos da IL6 e IL10 pelo método ELISA. O imunossensor constituído por eletrodos screen printed de ouro, foi baseado no uso da SAM formada pela deposição do ácido tioglicólico. Os antígenos foram imobilizados de modo orientado via grupos carboxílicos do TGA. Os resultados mostraram uma frequência de 73% (60/83) de IgG anti-PVB19 e uma correlação significativa entre os níveis de IL-6 e as medidas de atividade de AR nos pacientes com maior atividade inflamatória pelo EULAR. O maior contingente de pacientes IgG anti-PVB19 positivos estava com moderada e alta atividade pelo EULAR. O imunossensor eletroquímico apresentou uma resposta linear na curva de calibração, bom coeficiente de correlação e limite de detecção menor do que o método ELISA.

Palavras-chave: artrite reumatóide, imunossensor, anti-citrulina (anti-CCP), citocinas.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease, whose etiology is influenced by genetics, the environment, and infections. Among the various types of infections, the ones that stand out are the viral infections whose proteins alter the function of synoviocytes as occurs with Parvovirus B19 (PVB19). Studies have shown the involvement of the IL-6 and IL-10 cytokines in the physiopathogenesis of RA. Diagnosis of RA is based on clinical, radiological, and laboratory criteria. In the autoantibodies, the rheumatoid factor (RF) has high sensitivity and low specificity. The *Anti-cyclic Citrullinated Peptide (anti-CCP)* is an important marker for the diagnosis and as a predictive value of a worst-case prognosis. Its detection by ELISA has shown excellent diagnostic performance, but it is expensive and takes longer. Aiming for faster and more practical diagnostics, biosensors are ideal for point-of-care testing, due to their portability. The objectives of this thesis were to evaluate the correlation of the serum levels of IL-10 and IL-6 and the frequency of anti-IgG PVB19, with the clinical activity of RA, via composite indices of disease activity, under different treatments, in order to develop a label-free electrochemical immunosensor for anti-CCP. A cross-sectional study was developed to estimate the frequency of anti-IgGPVB19 and to determine the serum levels of IL-6 and IL-10 by the ELISA method. The immunosensor consisting of screen-printed gold electrodes was based on the use of the self-assembled monolayer (sam) formed by deposition of thioglycolic acid. The antigens were immobilized, driven via carboxylic groups of the TGA. The results showed a frequency of 73% (60/83) of IgG anti-PVB19 and a significant correlation between the levels of IL-6 and the activity measures of AR in the patients with higher inflammatory activity according to the EULAR. Most of the IgG anti-PVB19 positive patients had moderate and high activity according to the EULAR. The electrochemical immunosensor showed a linear response in the calibration curve, a good correlation coefficient, and a detection limit lower than the ELISA method.

Keywords: rheumatoid arthritis, immunosensor, anti-citrulline (anti-CCP), cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento da artrite reumatóide.....	22
Figura 2	Fisiopatologia da AR.....	25
Figura 3	Redes de citocinas na artrite reumatoide.....	26
Figura 4	Citrulinação.....	30
Figura 5	Deformidades em mão reumatóide.....	32
Figura 6	Nódulo reumatoide.....	32
Figura 7	Escleromalácia perforans.....	33
Figura 8	Ceratite ulcerativa periférica.....	33
Figura 9	Corte tomográfico -nódulo em parênquima pulmonar.....	34
Figura 10	Corte histológico- nódulo reumatóide.....	34
Figura 11	Lesões ósseas em carpo.....	36
Figura 12	Lesões erosivas em carpo e metacarpofalangeanas.....	37
Figura 13	Esquema básico de um biossensor.....	43
Figura 14	Expansão esperada no mercado de biossensores.....	44
Figura 15	Esquema do eletrodo impresso de ouro.....	50
Figura 16	Técnica da VC.....	52
Figura 17	SAM - MONOCAMADAS AUTOMONTADAS.....	54
Figura 18	Estrutura química do ácido tioglicólico.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios ACR 1987 para classificação da AR.....	38
Tabela 2	Critérios classificatórios para AR 2010 ACR/EULAR.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Prata
ACCP	Antipeptídeo Citrulinado Cíclico; <i>Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody</i>
AINH	Anti-Inflamatórios Não Hormonais
ACR	Colégio Americano de Reumatologia; American College of Rheumatology
APF	Fator Antiperinuclear; <i>Anti-Perinuclear Factor</i>
AR	Artrite Reumatóide
Au	Ouro
CDAI	Índice de Atividade Clínica de Doença; Index of Clinical Disease Activity
Cu	Cobre
DMARDs	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DAS 28	Escore da Atividade da Doença 28 Articulações; Disease Activity Score
E	Potencial
E1/2	Potenciais de meia onda
EC	Epítipo Compartilhado;
Ep2	Pico de meia altura;
Epa	Potencial de pico anódico;
Epc	Potencial de pico catódico
EIs	Eletrodos Impressos;
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente de Ligação de Enzimas
Fc	Fragmento adicional
FR	Fator Reumatóide
FS	Fibroblastos Sinoviais
HLA	Antígeno Leucocitário Humano; Human Leucocyte Antigen
HAQ	Questionário de Avaliação de Saúde; Health Assessment Questionnaire
ICAD	Índices Compostos da Atividade de Doença
IgG	Imunoglobulina G
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
IL10	Interleucina10
IL11	Interleucina11

IL15	Interleucina15
IFP	Interfalangeanas Proximais
IFD	Interfalangeanas Distais
Ipc	Corrente de picos catódico
Ipa	Corrente de pico anódico
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade; Major Histocompatibility Complex
MCF	Metacarpofalangeanas
MTF	Metatarsofalangeanas
NS1	Proteína não estrutural 1
PCR	Proteína C Reativa
PGE2	Prostaglandina E2
PVB19	Parvovírus B19
QCM	Microbalança Crystal Quartz; Quartz crystal microbalance
S	Enxofre
SAM	Monocamada Automontada; <i>Self-Assembled Monolayer</i>
Screen	Printing Electrode; Eletrodos Impressos
SDAI	Índice Simplificado de Atividade de Doença; Simplified Disease Activity Index
SPR	Ressonância de Plasma de Superfície; Surface Plasma Resonance
RANK	Receptor do Ativador do Fator Nuclear Kapa B
TGA	Ácido Tioglicólico; Thioglicolic Acid
Th1	(T helper 1)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa; <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
VC	Voltametria Cíclica
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. A artrite reumatóide.....	20
2.1.1 Conceito.....	20
2.1.2 Epidemiologia.....	20
2.1.3 Etiopatogenia.....	21
2.1.4 Fisiopatologia.....	23
2.1.5 Auto Anticorpos.....	27
2.1.6 Quadro Clínico.....	30
2.1.7 Diagnóstico.....	35
2.1.8 Tratamento.....	40
2.1.9 Avaliação da atividade da doença.....	41
2.2. Biossensores	42
2.2.1 Biossensores Eletroquímicos.....	45
2.2.2 Imunossensores Eletroquímicos Amperométricos.....	47
2.2.3 Tecnologia de Eletrodos Impressos.....	49
2.2.4 Técnicas Eletroquímicas.....	50
2.2.4.1 Voltametria Cíclica.....	51
2.2.5 Monocamadas Automontadas – SAM	53
2.2.5.1 ÁcidoTioglicólico.....	54
3. OBJETIVOS	56
3.1 Objetivo Geral	57
3.2 Objetivos Específicos	57
4. RESULTADOS	58
5. Artigo 1	60
6. Artigo 2	74
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87

8. Outros Resultados.....	89
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE	106
ANEXOS	119

1INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença crônica inflamatória, auto-imune (BIZZARO et al., 2001) e é três vezes mais freqüente em mulheres do que em homens (SCOTT et al., 2010). Estudos feitos na América do Norte e norte europeu mostram uma prevalência de 0,5-1,1%. No Brasil, tem prevalência de aproximadamente 0,46% (SENNA et al., 2004). A prevalência aumenta com a idade e é maior em mulheres acima de 65 anos, sugerindo a participação de fatores hormonais na patogenia (SCOTT et al., 2010).

A AR é uma doença multifatorial onde fatores genéticos e ambientais estão envolvidos tais como: os genes (HLA-DRB1 e PTPN22), tabagismo, poluentes, fatores dietéticos e infecções virais (GOODSON, FARRAGHER, SYMMONS, 2008; MCINNES, SCHETT, 2011). Dentre as infecções virais ressalta-se o Parvovírus B19 cujas proteínas virais podem modificar diretamente a função das células sinoviais (FRANSSILA; HEDMAN, 2006).

Na patogênese da AR estão envolvidos muitos fatores dentre eles os Linfócitos T, macrófagos, quimiocinas, metaloproteínas e citocinas pró-inflamatórias incluindo: fator de necrose tumoral *alpha* (TNF alfa), interleucina 1, (IL-1) e interleucina 6 (IL-6). As citocinas pró- inflamatórias iniciam e mantem o processo inflamatório no líquido e membrana sinoviais na AR (LINDEN, VAN DER et al., 2009). No tocante às citocinas anti-inflamatórias, durante os estágios iniciais da doença, a IL-10 inibe a diferenciação dos monócitos em células dendríticas que atuam juntamente com os macrófagos na fisiopatogenia da AR conforme mencionado acima (MITTAL; JOSHI 2002).

No diagnóstico da AR são utilizados critérios clínicos, laboratoriais e radiológicos (MOTA et al., 2012). O fator reumatóide (FR) é um destes critérios o qual está presente em 70% a 90% dos pacientes (SHMERLING; DELBANCO, 1991; FRISELL et al., 2013) e tem grande importância em relação ao prognóstico e quando em títulos altos e persistentes se relacionam a doença mais grave e, portanto, a um pior desfecho (SHMERLING; DELBANCO, 1991; FRISELL et al., 2013). Uma variedade de auto-anticorpos séricos e no líquido sinovial de pacientes com AR tem sido descrita, sendo mais específicos e direcionados contra proteínas citrulinadas (YOUNG et al., 1979; VENCOVSKÝ et al., 2003; FORSLIND et al., 2004). Esses anticorpos podem ser detectados no soro em cerca de 80% no soro de pacientes com AR com especificidade de 95% a 99%

(VOSSENAAR; VENROOIJ, VAN, 2004). Os testes para detecção de anticorpos Anti- Peptídeo Citrulinado Cíclico (ACCP), os quais se relacionam a uma doença com pior desfecho, têm mostrado excelente desempenho diagnóstico, especialmente o ensaio imunoenzimático (ELISA) (SCHELLEKENS et al., 1998, 2000a; GAALEN, VAN et al., 2005; COENEN et al., 2007; TAYLOR et al., 2011).

Novos peptídeos citrulinados foram obtidos e incorporados ao teste, atribuindo-lhe sensibilidade de 82% e especificidade 98,5% (VENROOIJ, VAN et al., 2002a). Entretanto, a determinação de ACCP nos serviços públicos de saúde no Brasil não está ainda disponível devido ao alto custo.

O tratamento da AR incluem fármacos, educação do paciente e de seus familiares, fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas. Dentre os fármacos são utilizados anti-inflamatórios não hormonais (AINH), corticóides, drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs) sintéticas e biológicas e drogas imunossupressoras (MOTA et al., 2012).

A avaliação periódica da resposta clínica e laboratorial ao esquema terapêutico instituído é muito importante e em decorrência da natureza multifacetada da AR, nenhum parâmetro clínico ou laboratorial, isoladamente, é capaz de expressar, de forma adequada, o nível de atividade inflamatória em determinado momento. Com o objetivo de possibilitar uma avaliação mais coerente com o real perfil do paciente em relação ao seu estado de atividade inflamatória, foram criados critérios de resposta tais como o índice de atividade de doença do *European League Against Rheumatism* (EULAR). Dentre os índices compostos de atividade de doença (ICADs), o índice de atividade de doença – *disease activity score 28* (DAS 28), o índice clínico de atividade de doença – *clinical disease activity index* (CDAI) são instrumentos de grande utilidade para a medida da atividade da AR numa escala contínua. O *Health Assessment Questionnaire* (HAQ), é uma medida genérica muito utilizada que avalia a incapacidade funcional e a escala analógica de dor (EVA) mensura o estado global de saúde, tanto pelo médico como pelo paciente e varia de 0-100 (PINCUS, SOKKA, 2004; SMOLEN et al., 2003).

Diante da necessidade da realização de métodos de diagnósticos mais rápidos e práticos, os biossensores se destacam, pois, agregam características desejadas, podendo ser desenvolvidos para operarem em serviços

descentralizados, tornando-se ideais para testes tipo “*point-of-care*” devido à sua portabilidade. Além disso, comparados aos testes ELISA têm a vantagem de poder fornecer resultados quantitativos, além de requererem amostras de pequenos volumes, na ordem de poucos microlitros (CORK, JONES, SAWYER, 2010).

Nos últimos anos, vários tipos de imunossensores e suas aplicações em dispositivos para triagem clínica de biomarcadores de proteínas (SUN et al., 2013) e diagnóstico precoce de muitas doenças (SHEN et al., 2011) surgem como ferramentas promissoras, em especial os imunossensores eletroquímicos que combinam a alta especificidade de métodos imunoquímicos tradicionais empregando sistemas eletroquímicos sensíveis. Uma grande variedade de eletrodos tem sido usada como suporte de imobilização em imunossensores eletroquímicos. Dentre estes, a tecnologia de eletrodos impressos (EIs) é considerada como promissora, pois pode ser comercializada em larga escala com vantagens como miniaturização, versatilidade, baixo custo e possibilidade de produção em massa (LEDRU et al., 2006; PING et al., 2012).

O presente estudo teve como alvo avaliar os níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, a frequência da IgG do PVB19 correlacionando com as medidas de atividade inflamatória da AR e desenvolver um imunossensor anti-peptídeo citrulinado cíclico (ACCP) no diagnóstico da AR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Artrite Reumatóide

2.1.1 Conceito

A AR foi inicialmente conceituada na década de 1850, entretanto uma classificação com critérios diagnósticos foi desenvolvida apenas em 1960 (SCOTT et al., 2010). Storey e colaboradores (1994) chamam a atenção ao fato da mesma ter sido descrita primeiramente por Sydenham em 1600 (STOREY et al., 1994). Pode ser definida como uma doença autoimune de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva a deformidade e destruição das articulações em virtude de erosões ósseas e da cartilagem (BIZZARO et al., 2001).

2.1.2 Epidemiologia

A AR acomete 0,5-1% da população adulta em regiões desenvolvidas (CARMONA et al., 2010; CHOY, 2012). Geralmente, está associada à incapacidade funcional progressiva, complicações sistêmicas, morte prematura, e a custos socioeconômicos (MCINNES; SCHETT, 2011). Embora alguns pacientes tenham doença leve, auto-limitada, muitos experimentam a destruição articular com incapacidade funcional grave e múltiplas comorbidades (CARMONA et al., 2010; CHOY, 2012).

Na América Latina, especialmente no Brasil, poucos estudos epidemiológicos estimam a prevalência das doenças reumáticas (SENNA et al., 2004). Estudo multicêntrico brasileiro em amostras populacionais das macrorregiões do país: norte, nordeste, centro-oeste e sul encontrou prevalência de até 1% da população adulta, correspondendo a uma estimativa de 1.300.000 pessoas acometidas (MARQUES et al., 1993) (SENNA et al., 2004). Em estudo posterior SENNA e colaboradores encontraram prevalência de 0,46% (SENNA et al., 2004). David e colaboradores obtiveram dados de incidência estimada de 13,4 casos/100.000 habitantes/ano e no que se refere ao gênero é mais comum no

feminino cerca de 3:1 mulheres em relação aos homens ocorrendo em todos os grupos étnicos (DAVID et al., 2013). Costuma se apresentar, principalmente, entre a 4ª e a 6ª década de vida, acometendo três vezes mais mulheres com idade inferior a 45 anos em relação aos homens. Tal diferença reduz com o avanço da idade se igualando após os 65 anos (SILMAN; PEARSON, 2002).

A evidência de agregação familiar foi a primeira indicação de uma susceptibilidade familiar à AR. Esta participação da hereditariedade é demonstrada pela prevalência a qual varia de 2% a 12% em parentes de primeiro grau dos pacientes, aumentando para 12-30 % em gêmeos monozigóticos e 5-10% em gêmeos dizigóticos do mesmo sexo (PERRICONE et al., 2011).

2.1.3 Etiopatogenia

É uma doença de patogênese complexa e multifatorial, com a participação de fatores genéticos, hormonais e ambientais (figura1). O fator que desencadeia o processo inflamatório sinovial pode ser um antígeno que ainda não foi identificado (GORONZY, WEYAND 2009). Dentre os fatores ambientais o tabagismo e o contato com microorganismos estão envolvidos. O sexo feminino e o histórico familiar participam aumentando as chances do indivíduo desenvolver AR. Os fatores genéticos contribuem com cerca de 60% da suscetibilidade para a doença, não só como um gatilho para a determinação do desenvolvimento da artrite, como também atuando na sua heterogeneidade (PERRICONE et al., 2011).

O HLA-DR4 foi relacionado à pacientes reumatoides caucasoides, principalmente com doença mais agressiva. Outras associações foram observadas em outros grupos como o HLA-DR1 e HLA DR10. Os alelos do gene HLA-DR4 associados à AR são: HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404 e HLA-DRB1*0405, este último principalmente em asiáticos. O alelo do gene HLA-DR1 associado à AR é: HLA-DRB1*0101.

Um antígeno “artritogênico” que pode ser tanto um antígeno exógeno como uma proteína viral pode desencadear a AR. O *Major Histocompatibility Complex* (MHC) de classe II promove a apresentação de peptídeos antigênicos para as células T CD4 +. Em indivíduos predispostos, a resposta do organismo a esses antígenos promoveria uma resposta autoimune mediada por células T. Mesmo

sem a persistência da exposição ao antígeno, os linfócitos T continuariam a responder aos antígenos próprios, perpetuando o processo inflamatório (KLARESKOG et al., 2011a).

O tabagismo é um fator ambiental de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de AR e a grande associação entre o tabagismo e a presença de HLA-DBR1 * 0404 ou outros alelos HLA foi observada em pacientes que apresentam anti-CCP (KLARESKOG et al., 2011b; MCINNES, SCHETT, 2011).

Evidências sinalizam que a presença do anti-CCP antecede o início dos sintomas da AR (KOKKONEN et al., 2010) e determina uma doença mais grave com maior desenvolvimento de erosões ósseas (BOISSIER et al., 2012; SCHETT; GRAVALLESE, 2012). No tocante à patogenicidade deste auto-anticorpo, foi relatada a presença de peptídeos citrulinados na sinóvia de pacientes com AR (MARTÍNEZ et al., 2011).

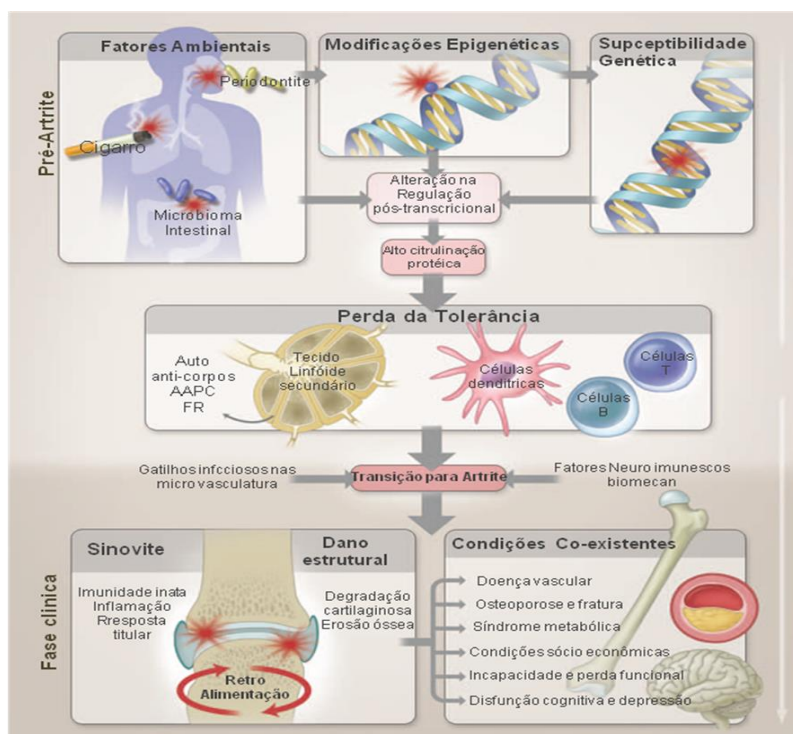


Figura 1. Desenvolvimento da artrite reumatóide. Interações do envolvimento genético na promoção da perda de tolerância para auto-proteínas que contêm um resíduo de citrulina, gerada por modificação pós-translacional.

Fonte: Adaptado de MCINNES, 2011.

Ainda no tocante à participação de fatores ambientais, agentes infecciosos como parvovírus humano B19, descrito por Cossart e colaboradores (1975),

pertencente à família *Parvoviridae* e gênero *Erythrovirus*, pode ter um papel na patogênese da AR como gatilho para desenvolvimento da doença em indivíduos geneticamente susceptível (MEYER, 2003; CORCORAN, 2004; ICTV, 2014). Alguns estudos demonstram a relação entre artropatia e parvovírus B19. Em infecções pelo parvovírus B19(PVB19), são encontrados sintomas articulares tais como artrite aguda geralmente poliarticular, não erosiva, em metacarpofalangeanas, punhos, acometendo 33 % de pacientes adultos do sexo feminino com duração de algumas semanas (TERCAN et al., 2013).

Em relação ao diagnóstico sorológico do PVB19, pode ser realizado pela técnica de ELISA para detecção da IgM que indica infecção recente ou IgG que indica infecção passada pelo PVB19. O genoma do PVB19 codifica duas proteínas que formam o capsídeo (VP1 e VP2) e uma proteína não estrutural (NS1). Todas essas estruturas têm funções que representam seu potencial artritogênico, ressaltando-se as alterações na imunidade celular, deposição de imuno complexos, efeitos citopáticos e elevação das citocinas inflamatórias (COLMEGNA; ALBERTS-GRILL, 2009).

A presença de produtos de B19 em linfócitos sinoviais, macrófagos, e células dendríticas foliculares de pacientes que têm AR têm sido investigadas. Em vários estudos, a persistência do PV B19 ocorreu em uma frequência maior na membrana sinovial de pacientes reumatóides quando comparados com os de osteoartrite, ou em controles saudáveis (COLMEGNA; ALBERTS-GRILL, 2009).

2.1.4 Fisiopatologia

O processo inflamatório na AR se inicia na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos a qual adquire uma estrutura similar ao de tecidos linfóides terciários com preponderância de linfócitos T CD4+. A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neovascularização formam o *pannus*. O *pannus* é um tecido inflamatório que invade o osso subcondral e a cartilagem articular com progressiva destruição (Figura-2). As propriedades destrutivas do *pannus* estão relacionadas à produção de metaloproteinases e outras proteinases com propriedades de destruir o colágeno e os proteoglicanos

(MCINNES, SCHETT, 2007; SCHETT; GRAVALLESE, 2012; GOLDRING et al., 2012).

Os osteoclastos e os fibroblastos sinoviais (FS) são os principais responsáveis pelos danos articulares, embora outros tipos de células também contribuam para a destruição da cartilagem e dos ossos, como neutrófilos e condrócitos. Por outro lado, os FS também regulam outros processos nas articulações em pacientes reumatóides, tais como propagação da inflamação, manutenção da estrutura do *pannus* (MCINNES; SCHETT, 2007; SCHETT; GRAVALLESE, 2012; GOLDRING et al., 2012).

Os FS têm papel primordial na embriogênese e na maturação do funcionamento das articulações. No período de desenvolvimento, o FS forma o principal constituinte do tecido novo das articulações, que em resposta ao ácido hialurônico, começa o processo de definição do espaço articular. Assim sendo, o FS é responsável pela produção de colágeno e outras moléculas que formam e mantêm a estrutura do tecido conjuntivo. Os FS são também os maiores produtores de ácido hialurônico, promovendo lubrificação na superfície das articulações e de enzimas, como as metaloproteinases de matriz (MMP), as quais tem a capacidade de digerir o tecido conjuntivo auxiliando na manutenção e flexibilidade da estrutura da cápsula articular (MCINNES, SCHETT, 2007; SCHETT; GRAVALLESE, 2012; GOLDRING et al., 2012). A mais importante metaloproteinase na AR é a metaloproteinase 1 (MMP-1), pois sua produção é aumentada em resposta ao estímulo de citocinas (inclusive TNF- α e IL-1 α) e por ser a única MMP com capacidade de digerir colágeno tipo II, o principal colágeno das cartilagens (MCINNES, SCHETT, 2007; SCOTT, KINGSLEY, 2009). Outra característica importante dos FS é sua capacidade de produzir uma série de mediadores proinflamatórios, incluindo citocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos da inflamação (MCINNES, SCHETT, 2007).

Esses mediadores exercem ação sobre vários tipos de células, dentre elas linfócitos, neutrófilos, células endoteliais e osteoclastos, levando a uma série de efeitos na articulação, incluindo angiogênese, inflamação e erosão óssea. A alta produção de fatores de crescimento pode levar a neoangiogênese e posterior formação do *pannus* já mencionado anteriormente (McINNES, SCHETT, 2007).

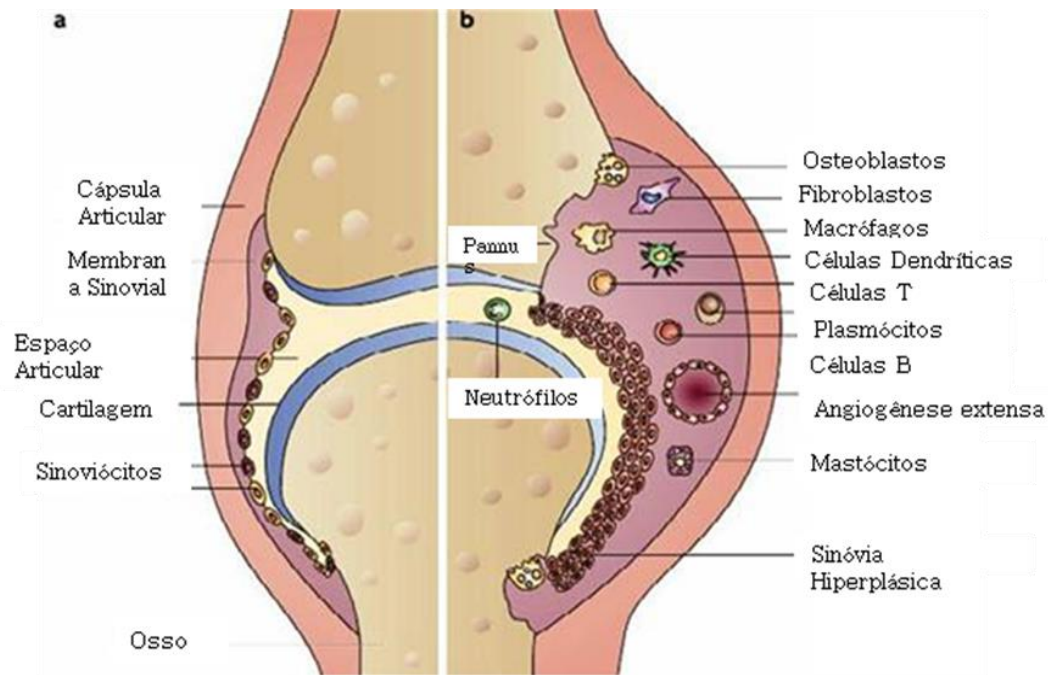


Figura 2: Fisiopatologia da AR

Fonte: http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g9_metotrexato/artriterreumatoide.html. Acessado 10/01/14. Traduzido.

Uma série de produtos formados pelos FS, incluindo IL-8, IL-16 e o ligante receptor ativador para fator nuclear Kb (RANK) atraem várias células inflamatórias da corrente sanguínea para as articulações. Esses mediadores químicos, conjuntamente com outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α – *tumoral necrosis fator*), IL-11, IL-15, ligante do RANK, PGE2, permitem que a vasculatura se torne mais permeável para células inflamatórias. Destes mediadores, ressalta-se o ligante do RANK importante na destruição da articulação capaz de recrutar monócitos conduzindo sua diferenciação em osteoclastos ativos, podendo interagir com o osso provocar erosões (McINNES, SCHETT, 2007; SCHETT, TEITELBAUM, 2009). Condrócitos respondem a essas citocinas reduzindo a produção de colágenos e proteoglicanos e ao mesmo tempo aumentando a síntese de collagenase e estromolisina (TAK, BRESNIHAN, 2000).

As perdas focais de osso marginal e subcondral contribuem de forma crucial para a morbidade da doença. A ativação e recrutamento de linfócitos e macrófagos são influenciados por citocinas e mediadores inflamatórios tais como o TNF- α , responsável pela ativação de linfócitos, estimulação da liberação de

enzimas proteolíticas pelos macrófagos e produção de outras citocinas inflamatórias como a IL-6 e IL-13 (TAK, BRESNIHAN, 2000).

Na AR o equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias determina o grau e extensão da inflamação, e desta forma conduzem a diferentes desfechos clínicos (SIVALINGAM et al., 2007). A resposta T auxiliar do tipo 1 gera a produção de interferon-gama (IFN- γ) que estimula a liberação de TNF- α , interleucina-1 beta (IL-1 β) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais. Além destes mediadores, a IL-17 produzida por linfócitos T também colabora para destruição de colágeno e fomento da produção de IL-6 (KLIMIUK et al., 1999; FIRESTEIN, 2003).

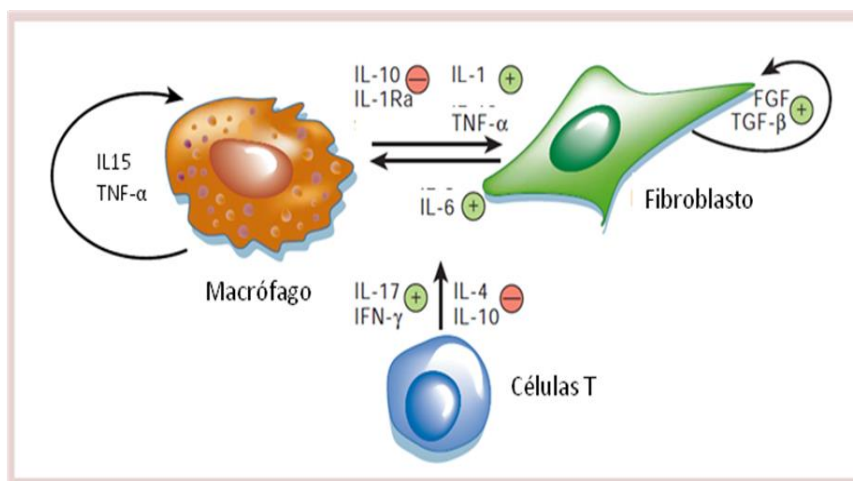


Figura 3: Redes de citocinas na artrite reumatóide.

Fonte: Adaptado de Firestein, 2003.

<http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6937/full/nature01661.html>

Recentemente, as funções desempenhadas pelos linfócitos B têm sido reconhecidas como significativas na patogênese da AR. A migração de células T e B com formação de agregados com estrutura de folículos terciários, a expressão de moléculas co-estimulatórias e a produção aumentada de IL6 que estimulam linfócitos B, são indicadores da hiperatividade destas células na doença (YOUINOU, JAMIN, SARAUX, 2007; BURMESTER, FEIST, DÖRNER, 2014).

A IL 10 é considerada a citocina anti-inflamatória mais importante no ser humano. Segregada por uma variedade de células, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, granulócitos, células

epiteliais, queratinócitos e mastócitos. Esta citocina atua durante a resposta imune tendo como uma das suas principais funções a de limitar a resposta inflamatória em curso, protegendo o hospedeiro de excessiva destruição tecidual. A IL-10 atua inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-alfa, IL-1, IL-6 e IL-12; IFN γ desativando macrófagos, inibindo a secreção de citocinas Th1, tais como a IL-2, controla a diferenciação e proliferação de macrófagos, células T e células B (GLOCKER et al., 2011). O papel de IL-10 na AR se embasa de estudos em ratos, quando anticorpos contra IL-10 agravam a doença, assim como uma completa falta de IL-10. Isto posto é ressaltado o papel da IL-10 como uma citocina passível a ser utilizada para tratamento da AR (HENNINGSSON et al., 2012).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica uma das principais citocinas já propostas como biomarcadores em pacientes com AR influenciando respostas imunes antígeno específicas e reações inflamatórias, constituindo-se desta forma um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Sua produção é realizada por vários tipos celulares, sendo as células B, T e monócitos as principais fontes da mesma. Níveis aumentados de IL-6 são vistos em pacientes com AR quando comparados com indivíduos saudáveis demonstrando sua relevância no monitoramento da atividade da doença e da resposta ao tratamento (PARAMALINGAM et al., 2007; BRENNAN, MCINNES, 2008).

2.1.5 Auto- Anticorpos

A Artrite reumatóide se caracteriza pela expressão de auto-anticorpos (CONRAD et al., 2010). Dentre eles o primeiro a ser descrito foi o Fator Reumatóide (FR) inicialmente por Waller, em 1940 e Rose em 1949, que se refere a um grupo de auto-anticorpos das classes IgG, IgM e IgA os quais tem, em comum, a capacidade de reagir com diferentes epítomos da porção Fc da molécula da imunoglobulina G humana (SHMERLING; DELBANCO, 1991; SCOTT et al., 2010).

Atualmente o FR não é considerado um marcador específico para o diagnóstico de AR, entretanto está estabelecido como um dos critérios para

classificação da AR pelo *American College of Rheumatology* (ACR). O FR é encontrado em 70% a 90% dos pacientes reumatóides (SHMERLING; DELBANCO, 1991; INGEGNOLI, CASTELLI, GUALTIEROTTI, 2013). Entretanto, está presente em, aproximadamente, 33% dos pacientes na fase inicial da doença. Sua especificidade é de 59% a 65% podendo ser encontrado em outras condições clínicas como a hanseníase, doença de Chagas, crioglobulinemias, lupus eritematoso sistêmico, síndrome de *Sjögren*, esclerose sistêmica, polimiosite, algumas neoplasias e em uma pequena parcela de indivíduos saudáveis, principalmente, em idosos (SONG, KANG, 2010). Evidências mostram que, fisiologicamente, nos indivíduos normais, o FR pode depurar imunocomplexos, aumentar a efetividade de anticorpos IgG de baixa avidéz ou apresentar antígenos às células T (HOGBEN, DEVEY, 1986; MUHAMMAD SAFEER, et al., 2011).

Muitos pacientes podem apresentar FR em fases mais tardias da doença, outros 15%, não apresentam, sendo considerados reumatóides soronegativos. O fator antiperinuclear (APF) descrito por Nienhuis; Manderna em 1964, é um anticorpo contra grânulos cerato hialinos os quais são eléto-densos, ricos em cisteína, que se concentra ao redor do núcleo das células da mucosa oral. Estudo ulterior com imunofluorescência indireta utilizando como substrato o epitélio ceratinizado de mucosa oral identificou as proteínas profilagrina/filagrina como antígenos alvo deste anticorpo. Tais antígenos também foram detectados em estrato córneo do esôfago de rato. O APF é identificado em 41 a 91% dos pacientes (VENROOIJ, PRUIJN 2014), com especificidade de 90% e sensibilidade em torno de 70%. O APF é encontrado em títulos elevados tanto em pacientes reumatóides positivos como em reumatóides negativos, especialmente, na fase incipiente da doença (BOERBOOMS et al., 1990).

A caracterização de um anticorpo específico e sensível para a AR, especialmente em sua fase inicial, é de grande importância na abordagem do paciente reumatóide (SCHELLEKENS et al., 2000b; GALEN, VAN et al., 2004; EGERER et al., 2009; STADT, VAN DE et al., 2011; ABOLGHASEMI, GITIPOUR, MORTEZA, 2013). O peptídeo da filagrina, o qual tem o papel de conduzir a reatividade antigênica, é um peptídeo contendo o aminoácido citrulina e isso foi demonstrado pelo fato de que a pró-filagrina/filagrina constituem antígenos do anticorpo antiperinuclear e antiqueratina. O anti-CCP pode ser detectado em 25%

dos indivíduos no período de um ano e meio a nove anos do aparecimento dos primeiros sintomas e no ano que antecede os sintomas, a sensibilidade aumenta para 52%, indicando a eficiência destes testes em prever o desenvolvimento futuro da AR (VOSSENAAR, VENROOIJ, VAN, 2004).

A citrulinização (Figura 4) acontece de maneira fisiológica, na diferenciação e apoptose de células epidérmicas e consiste na deaminação de um resíduo de arginina pela peptidilarginina deiminase, fenômeno que ocorre, consideravelmente, na profilagrina e filagrina (SCHELLEKENS et al., 2000b; VENROOIJ, VAN et al., 2002b; VAN VENROOIJ, PRUIJN, 2000; BIZZARO et al., 2001; MEYER et al., 2003; FORSLIND et al., 2004). A profilagrina tem 20% dos resíduos de arginina deaminados para citrulina. A sensibilidade da detecção do peptídeo citrulinado, poderá ser aumentada ao se realizar a ciclização cuja finalidade é a maior exposição da porção citrulinado e deste modo favorecer a ligação com o anticorpo (SCHELLEKENS et al., 2000b). Assim, anticorpos contra o antígeno peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) podem ser detectados com sensibilidade e alta especificidade em pacientes com artrite reumatóide (SCHELLEKENS et al., 2000b; NIEWOL, HARRISON, PAGET, 2007; HOLERS, 2013).

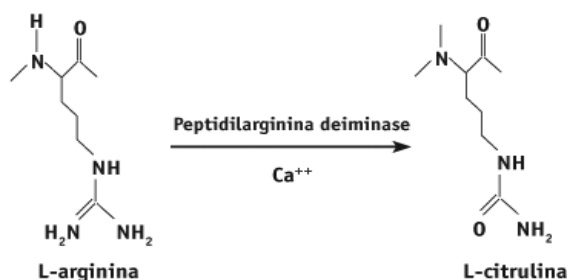


Figura 4: Citrulinização

2.1.6 Quadro Clínico

As manifestações clínicas da AR podem iniciar em qualquer idade, todavia ocorrem principalmente na quarta e quinta décadas de vida. A característica primordial do quadro articular da AR é a inflamação da sinóvia (sinovite), acometendo qualquer uma das articulações diartrodiais do corpo (Figura 5). A queixa clínica é de dor, inchaço e limitação dos movimentos das articulações afetadas. A AR pode se apresentar de maneira muito diversificada, desde sintomas mais brandos, de menor duração, com caráter palindrômico até uma poliartrite cumulativa e destrutiva, associada à vasculite bem como a outras manifestações extra-articulares (GOELDNER et al., 2011). As articulações mais comumente acometidas são as sinoviais periféricas, tais como metacarpo e metatarsofalangeanas, tornozelos e punhos. Por outro lado, também pode haver comprometimento de joelhos, ombros, cotovelos e quadris. Articulações como a temporomandibular, as articulações sinoviais da coluna e a laringe são ocasionalmente afetadas, o que pode acarretar dificuldades no diagnóstico (MAJITHIA, GERACI, 2007).

Observa-se ao exame físico presença de dor, aumento de volume das articulações, derrame intra-articular, calor e, eventualmente, rubor. Articulações profundas, tais como quadris e ombros, esses achados podem não ser evidentes (WOOLF, ÅKESSON 2008).

Ressalta-se o acometimento poliarticular, entretanto, a doença pode iniciar e eventualmente persistir como mono ou oligoarticular. A artrite dos punhos, metacarpofalangeanas (MCF) e interfalangeanas proximais (IFP) é frequente desde o início do quadro. O acometimento das interfalangeanas distais (IFD) é raro, o que é útil para diferenciar a AR de outras condições, como a osteoartrite e a artrite psoriásica. A particularidade do envolvimento simétrico, todavia em se tratando das IFP, MCF e metatarsofalangeanas (MTF), a simetria não necessita ser encontrada. (WOOLF, ÅKESSON 2008).

O quadro articular costuma ser cumulativo e a rigidez matinal prolongada, caracterizada por enrijecimento e sensação de inchaço, percebida, principalmente pela manhã, diferente rigidez observada na osteoartrite geralmente 5 a 10 minutos (SALAFFI, 2009; KHAN, 2009). Deformidades articulares decorrentes da

inflamação persistente, como *boutonnière* ou em "pescoço de cisne", são patognomônicas da AR, cuja abordagem terapêutica não foi adequada (GOELDNER et al., 2011). Além dos sintomas articulares, pacientes com AR apresentam com frequência manifestações extra-articulares, quadros cutâneos (nódulos subcutâneos Figura 6), oculares (Figura 7, Figura 8), síndrome de *Sjögren*, vasculites, pleuro pulmonares (nódulos pulmonares Figura 9), cardíacos, hematológicos, neurológicos e osteometabólicos (MYASOEDOVA et al., 2011). Os nódulos reumatóides (Figura 10) constituem a manifestação extra-articular mais comum podendo além do tecido subcutâneo, pulmão se localizarem no coração, olhos e cérebro (MYASOEDOVA et al., 2011).

O acometimento extra-articular, mais observado em pacientes com doença grave, poliarticular, sorologia positiva para FR ou anticorpos anti-CCP. denota pior prognóstico e dificulta o tratamento (TURESSON, 2013). As doenças de caráter isquêmico são importantes em pacientes com AR, pois representam a causa de aproximadamente 40% das mortes entre esses indivíduos (SOLOMON et al., 2001).



Figura 5: Deformidades em mão reumatóide.

Fonte: <http://fisioterapiapersonalizada.ordpress.com/2012/05/14/6-diferencas-entre-osteoartrite-e-artrite-reumatoide> Acessado 10/01/14. Copiado.



Figura 6: Nódulo reumatoide

Fonte: <http://www.mdsaude.com/2010/02/artrite-reumatoide.html>. Acessado 10/01/14. Copiado.

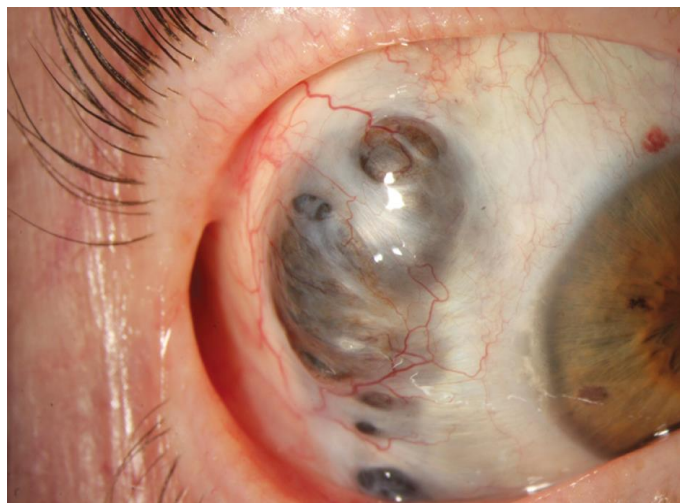


Figura 7: Escleromalácia perforans.

Fonte: http://www.nature.com/nrrheum/journal/vaop/ncurrent/fig_tab/nrrheum.2013.185_F4.html Acessado 10/01/14. Copiado.



Figura 8: Ceratite ulcerativa periférica.

Fonte: http://www.nature.com/nrrheum/journal/vaop/ncurrent/fig_tab/nrrheum.2013.185_ft.html Acessado 10/01/14. Copiado.



Figura 9: Corte tomográfico - nódulo em parênquima pulmonar.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0482-0042008000100011&script=sci_artt. Acessado 10/01/14. Acessado 10/01/14. Copiado.

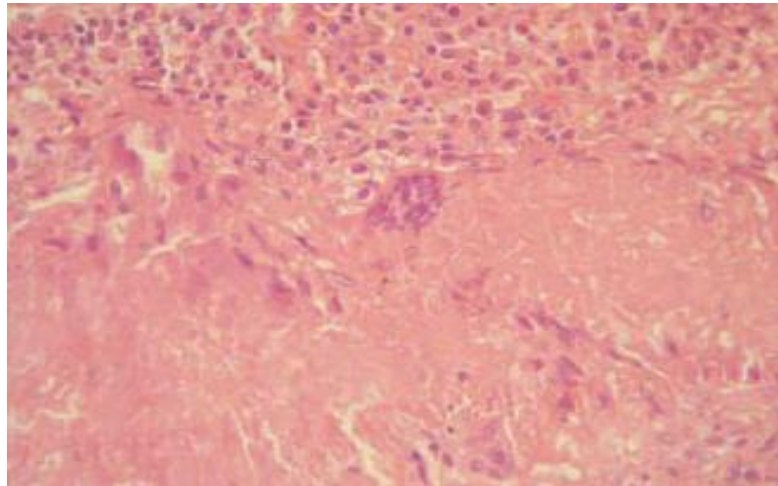


Figura 10: Corte histológico- nódulo reumatóide.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0482-50042008000100011&script=sci_arttext#fig3
Acessado 10/01/14. Copiado.

Estudos brasileiros descreveram o acometimento poliarticular, com sinovite persistente em mãos, rigidez matinal prolongada, contagem de articulações dolorosas e edemaciadas elevada, bem como fadiga como manifestações iniciais da doença (LOUZADA-JUNIOR et al., 2007; MOTA et al., 2010).

2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico precoce da AR é muito importante para que se possa intervir adequadamente evitando os danos irreparáveis na articulação e é estabelecido considerando-se achados clínicos e exames complementares. Nenhum teste isolado, seja laboratorial, de imagem ou histopatológico, confirma o diagnóstico (ALETABA et al., 2010).

As provas laboratoriais de fase aguda são utilizadas na avaliação inicial e no acompanhamento do paciente reumatoide para mensuração da atividade inflamatória e não para diagnóstico. A velocidade de hemossedimentação (VHS) é uma prova não específica que mede a extensão de queda das hemácias em uma coluna num dado intervalo de tempo. A VHS denota a atividade de algumas semanas (elevação e declínio lentos) e sofre influência de diversos fatores, como idade, sexo e anemia (ROSA NETO, CARVALHO, 2009). Em alguns casos, como

na AR inicial, a VHS pode ser uma ferramenta melhor para o seguimento do paciente, entretanto a análise do exame deverá ser feito em até duas horas após a coleta (ROSA NETO, DE CARVALHO, 2009).

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda considerada um marcador sensível na monitoração da inflamação aguda. Níveis elevados de PCR no início correspondem a um pior desfecho e à doença erosiva progressiva (ROSA NETO, DE CARVALHO, 2009). Por causa da sua capacidade de ativar complemento, neutrófilos, monócitos e macrófagos, a PCR está positiva na maioria dos pacientes com artrite reumatóide e é bastante valiosa na avaliação da doença, na correlação de seus valores com a progressão radiológica e a resposta ao tratamento (SMOLEN et al., 2010). Ressalta-se que pode haver grande discordância entre resultados de VHS e PCR em até 28% dos pacientes, sendo os de pior estado clínico aqueles com PCR e VHS elevadas. Não se pode esquecer que a doença progride independentemente da normalização dos valores da PCR. Antes do aparecimento de sintomas, altos níveis de PCR estão associados a maiores níveis de FR ou ACCP (ROSA NETO, CARVALHO, 2009). Em estudo prospectivo brasileiro de AR inicial, mais de dois terços dos pacientes do estudo mostraram aumento das provas de atividade inflamatória utilizadas (VHS e PCR) na primeira consulta (MOTA b et al., 2010).

Os auto anticorpos, já mencionados anteriormente, atuam como potenciais marcadores de diagnóstico da AR. É muito importante a busca de biomarcadores relacionados a AR durante a fase pré-clínica os quais são altamente preditivos de futuro aparecimento de uma doença clinicamente definida (DEANE, 2013). Os estudos iniciais versam primordialmente em grande parte sobre auto-anticorpos de FR, assim como o anticorpo ACCP uma gama de marcadores de inflamação, várias citocinas, quimiocinas e fatores ambientais tais como a influência de antígenos virais (MAJKA et al., 2008; NIELEN et al., 2003) .

Ainda no que diz respeito ao diagnóstico os métodos de imagem tais como a radiografia convencional a qual é o mais utilizado na avaliação do dano estrutural articular, além da ultrassonografia e ressonância magnética.



Figura 11: Lesões ósseas em carpo.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0482-50042012000400014&script=sci_arttext.
Acessado 10/01/14. Copiado.



Figura 12: Lesões erosivas em carpo e metacarpofalangeanas.

Fonte: <http://www.stetoscopio.net/organi-interni/lalcool-previene-lartrite-reumatoide/> Acessado em 10/01/14. Copiado.

A classificação da AR era exclusivamente baseada nos critérios introduzidos pelo ACR em 1987, apresentados na Tabela 1, os quais não contemplavam os quadros de artrite inicial (ARNETT et al., 1988). Os critérios classificatórios para AR do ACR foram desenvolvidos com base em indivíduos com AR de longa data, e considerados o padrão para a seleção de pacientes para ensaios clínicos. Estes critérios demonstram sensibilidade de 91%-94% e

especificidade de 89% para AR estabelecida. Entretanto, eles incluem características pouco comuns na AR de início recente, como os achados radiográficos (erosões) e nódulos reumatóides, sendo considerados insuficientes para a identificação de pacientes com quadros incipientes (sensibilidade de 40%-90% e especificidade de 50%-90%) (SAKELLARIOU, SCIRÈ, MONTECUCCO, 2013).

Tabela 1: Critérios do Colégio Americano de Reumatologia 1987 para classificação da artrite reumatoide.

Critério	Definição
1) Rigidez matinal	Rigidez matinal com duração de pelo menos 1 hora até a melhora máxima
2) Artrite de três ou mais áreas articulares	Ao menos três áreas articulares simultaneamente afetadas, observadas pelo médico (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos e metatarsofalangeanas)
3) Artrite das articulações das mãos	Artrite em punhos ou metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais
4) Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo de áreas de ambos os lados do corpo
5) Nódulos reumatóide	Nódulos subcutâneos sobre proeminências ósseas, superfícies extensoras ou em regiões justa-articulares
6) Fator reumatoide sérico positivo	Presença de quantidades anormais de fator reumatóide
7) Alterações radiográficas	Radiografias pósterio anteriores de mãos e punhos demonstrando rarefação óssea justa-articular ou erosões

Para a classificação como artrite reumatóide, o paciente deve satisfazer a pelo menos 4 dos 7 critérios. Os critérios 1 até o 4 devem estar presentes por, no mínimo, 6 semanas. Copiado de MOTA et al., 2011.

Isso posto se fez necessário o estabelecimento de novos critérios de classificação para a AR, enfocando de maneira especial a fase precoce da enfermidade (ALETABA et al., 2010). Os novos critérios classificatórios ACR/EULAR podem ser aplicados a qualquer paciente, desde estejam presentes: 1) evidência de sinovite clínica ativa no momento do exame em pelo menos uma articulação; 2) os critérios só contemplam pacientes para os quais tenham sido excluídos outros diagnósticos. Os critérios (Tabela 2) seguem um sistema de pontuação utilizando um escore de soma direta. As manifestações são divididas em quatro domínios: acometimento articular, sorologia, duração dos sintomas e provas de atividade inflamatória. No domínio sorologia a positividade do ACCP tem um valor na pontuação final para a classificação do paciente com quadro inicial. Na contagem das articulações afetadas pode se lançar mão de métodos de imagem (ultrassonografia e ressonância magnética), em caso de dúvida. Uma pontuação maior ou igual a seis classifica um paciente como tendo AR (ALETABA et al., 2010; RADNER et al., 2014).

Tabela 2: Critérios classificatórios para AR 2010 ACR/EULAR.

População-alvo (quem deve ser testado?)

Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).*

Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença.

***Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.**

Acometimento articular (0-5)

1 grande articulação.....	0
2-10 grandes articulações.....	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas).....	2
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas).....	3
> 10 articulações (pelo menos uma pequena).....	5
1 grande articulação.....	0
2-10 grandes articulações.....	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas).....	2
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas).....	3
> 10 articulações (pelo menos uma pequena).....	5

Sorologia (0-3)

FR negativo E ACPA negativo.....	0
FR positivo OU ACPA positivo em baixos títulos.....	2
FR positivo OU ACPA positivo em altos títulos.....	3

Duração dos sintomas (0-1)

< 6semanas.....	0
≥ 6semanas.....	1

Provas de atividade inflamatória (0-1)

PCR normal e VHS normal.....	0
PCR anormal ou VHS anormal.....	1

Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR. O domínio acometimento articular refere-se a qualquer articulação dolorosa ou inchada (excluindo interfalangeanas distais do pé ou mão, primeira metatarsofalangeana e primeira carpometacarpena). Evidência adicional obtida por exames de imagem pode ser utilizada para confirmação dos achados clínicos. Consideram-se, para fins de classificação, como pequenas articulações as metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, metatarsofalangeanas (segunda a quinta), primeira interfalangeanae punhos, e como grandes articulações ombros, cotovelos, quadril, joelhos, tornozelos. Articulações adicionais (temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, entre outras) podem ser contadas, na avaliação de "mais de 10 articulações", desde que uma pequena articulação (ao menos) esteja acometida. No domínio sorologia, considera-se o resultado de fator reumatoide ou de anticorpos antipteptídeos/ proteínas citrulinadas negativo se o valor encontrado for igual ou menor ao limite superior da normalidade para o respectivo laboratório; positivo baixo se o resultado encontrado for maior que o limite superior da normalidade, mas menor ou igual a 3 vezes o limite superior da normalidade; e ositivo alto quando o valor encontrado for superior a 3 vezes o limite superior da normalidade. O domínio duração dos sintomas se refere ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da avaliação. Já as provas de atividade inflamatória (velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa) são consideradas normais ou anormais de acordo com o valor de referência do laboratório utilizado. Copiado de: Mota et 2011.

2.1.8 Tratamento

O tratamento da AR tem como alvo induzir a remissão clínica inibindo a progressão de danos articulares estruturais e funcionais. Para este, são utilizados cinco classes de medicamentos: analgésicos, anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), corticosteróides, drogas anti-reumáticas modificadores da doença (DMARDs) e terapia alvo com agentes biológicos (SINGH et al., 2012a).

Os DMARDs representam o pilar para o tratamento da AR e consiste nas chamadas drogas de primeira linha em associação com os sintomáticos. São categorizadas em não biológicas e biológicas. Elas reduzem o edema e a dor articular, limitam danos e melhoram a função. Entre os DMARDs não biológicas, o metotrexato (MTX) (PEREIRA et al., 2009) é o fármaco mais usado, porém outros como o leflunomida (GOLICKI et al., 2012), sulfassalazina (VAN DER HEIJDE et al., 1989) também fazem parte do arsenal terapêutico, bem como a hidroxicloroquina /cloroquina (FOX et al., 1993; CAPELL et al., 2007; (SINGH et al., 2012b).

Na falha das drogas acima referidas, pode-se lançar mão da terapêutica biológica, de forma isolada ou em conjunto com as DMARDs não biológicas. O metotrexato e leflunomida são os mais utilizados nesta terapia combinada. Os anti-TNF α podem ser considerados precursores deste grupo de DMARDs biológicas. Na indústria farmacêutica, existem atualmente cinco drogas desta classe disponíveis: infliximabe, etanercept, adalimumabe (HETLAND et al., 2010; BARRA et al., 2014), certolizumabe pegol (EMERY et al., 2009). E Golimumabe (ZIDI et al., 2011). Em outras categorias temos um antagonista do receptor da IL-1(anakinra), uma droga depressora das células B (rituximabe) (KEYSTONE et al., 2009) antagonista da IL-6 (tocilizumabe) (SINGH, BEG, LOPEZ-OLIVO, 2011) e um inibidor da co-estimulação das células T (abacept) (SINGH et al., 2011).

A introdução de agentes biológicos alterou dramaticamente a terapia para pacientes com artrite reumatoide. Avanços no conhecimento da citocinas e da patogênese da AR têm contribuído para o desenvolvimento de novos agentes biológicos, e traduzido resultados da investigação na prática clínica (MCINNIS, O'DELL, 2010).

2.1.9 Avaliação da atividade de doença.

Após definido o diagnóstico da AR, é importante na avaliação inicial da doença, caracterizar os parâmetros que serão úteis para a mensuração da atividade da doença. Alguns dos parâmetros validados que se correlacionam com a atividade da AR são: escalas visuais da dor pelo paciente, da atividade de

doença pelo paciente e pelo médico, número de articulações dolorosas e edemaciadas, instrumentos de avaliação da capacidade funcional (como o HAQ - *Health Assessment Questionnaire*), provas inflamatórias (VHS e/ou PCR), fadiga, duração da rigidez matinal, radiografia de mãos, punhos e pés, e índices compostos da atividade de doença (ICADs). Os principais ICADs são o DAS28 (*Disease Activity Score 28*), o SDAI (*Simplified Disease Activity Index*), CDAI (*Clinical Disease Activity Index*) e a escala analógica de dor (EVA) (PINCUS, SOKKA, 2004; SMOLEN et al., 2003). Esses índices utilizam uma contagem articular simplificada com vinte e oito articulações: (IFP, MCF, punhos, cotovelos, ombros e joelhos) os quais determinam um valor numérico para atividade da AR e também critérios de resposta terapêutica tais como o índice de atividade de doença do *European League Against Rheumatism* (EULAR). (PINCUS, SOKKA, 2004; SMOLEN et al., 2003).

Existe uma boa correlação entre os ICADs (CDAI, SDAI e DAS28) e qualquer um deles pode ser utilizado isoladamente. Pacientes que estão em remissão ou baixa atividade de doença, por qualquer índice, também mostram menor progressão radiográfica e melhor evolução funcional. Tendo em vista a interação complexa de múltiplas citocinas observada na AR, como a IL-6 e a IL10, a avaliação dos níveis séricos das mesmas e sua correlação com os ICADs acima mencionados é um possível caminho a ser percorrido com o objetivo de alcançar a remissão clínica ou caso isso não seja possível, obter um estado de baixa atividade da doença (MILMAN et al., 2010).

No ensejo de métodos de diagnósticos mais rápidos e práticos para uma abordagem terapêutica mais adequada os biossensores se sobressaem ao fornecerem resultados quantitativos, necessitando de amostras de reduzido volume, na ordem de poucos microlitros (CORK et al., 2010).

2.2 Biossensores

Nas últimas décadas, as ciências analíticas têm experimentado um avanço relacionado à capacidade de obtenção de informações químicas em diversos sistemas, proporcionando um elevado desenvolvimento analítico,

resultando na automação, miniaturização e simplificação destes objetos em estudo (MURPHY, 2006).

Os primeiros estudos sobre o desenvolvimento de biossensores iniciaram-se no século passado e eram frequentemente chamados eletrodos enzimáticos cujo primeiro foi descrito por Clark e Lyons em 1962, para a determinação de glicose (YOO, LEE, 2010).

Um biossensor é um dispositivo compacto que dá informação analítica por meio de um elemento biológico ligado a um transdutor. O elemento biológico reconhece um determinado analito através de uma interação ou reação biológica convertendo-a em um sinal mensurável. Conforme a nomenclatura da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) biossensor (Fig.13) é um dispositivo que utiliza especificamente reações bioquímicas mediadas por enzimas isoladas, lectinas, tecidos, organelas, anticorpos entre outras espécies biológicas (MONOŠÍKA, STREĎANSKÝB, ŠTURDÍK, 2012). Nesse último caso, dá-se o nome de imunossensor, ou seja, detectam-se especificamente interações do tipo antígeno-anticorpo (Ab-Ag).

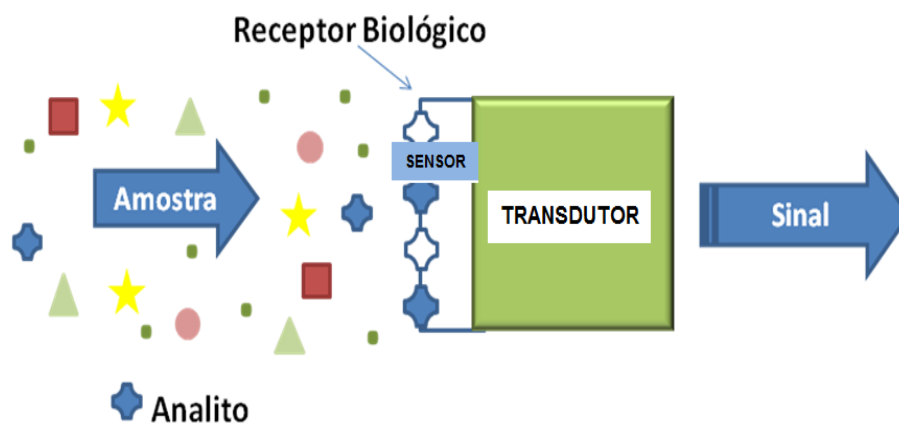


Figura: 13 Esquema básico de um biossensor.

Fonte: <http://metodosselectroanaliticosusc.blogspot.com.br/> Adaptado de (MONOŠÍKA, STREĎANSKÝB, ŠTURDÍK, 2012). <https://drive.google.com/?tab=mo&authuser=0#folders/0B62QRc6T3GCOGQ0YmYxYWEtNDUXZC00NjYxLTliYzgtNjNmMWExMjM4NzNj>

Assim, nos últimos anos, tem-se tornado disponível no mercado um maior número de detectores portáteis que permitem a redução do tamanho da amostra e economia do tempo de análise. Os biossensores potencializaram o desenvolvimento de diversas técnicas eletroquímicas que oferecem rapidez e simplicidade (GIBSON et al., 1992). Este gênero de detector permite realizar as mais variadas tarefas como: efetuar controle em-linha a nível industrial, análise ambiental em tempo real, automatização de análises bioquímicas, análise *in vivo*, e detecção de substâncias biológicas relevantes, como hormônios e fármacos (HE et al., 2007; ZHU et al., 2007).

Os biossensores permitem que os procedimentos de imunoensaios alcancem um novo patamar, tornando possíveis mudanças significativas na forma de realizar as análises, simplificando o procedimento analítico com resultados seguros e rápidos (SKOTTRUP et al., 2008).

Thusu estimou que a receita global para o mercado de biossensores crescerá de forma significativa, ultrapassando a marca de US\$ 14 bilhões em sete anos (2009 a 2016) (Figura 14). Estas receitas foram estimadas a crescer com um Crescimento Composto Anual de 11,5% entre 2009 e 2016. Grande parte deste crescimento foi relacionada ao aumento na demanda nas áreas de segurança, monitoramento ambiental, bem como do segmento de diagnóstico do tipo *homecare*. Na área ambiental, a estimativa é que o desenvolvimento dos biossensores chegue a US\$ 32,7 milhões até o ano 2015. Dispositivos baseados na bioluminescência têm ganhado popularidade em análises da qualidade da água em países como França, Alemanha, Espanha e Suécia (THUSU, 2010).

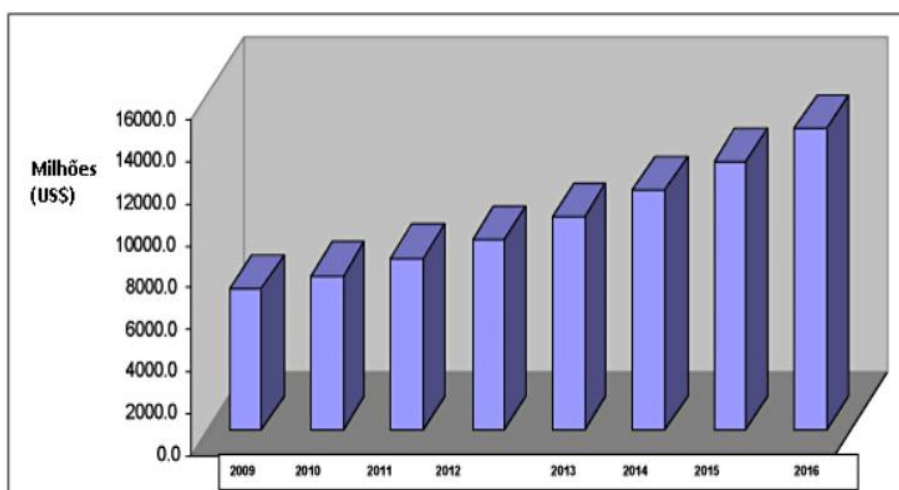


Figura 14: Expansão esperada no mercado de biossensores que se prevê um Crescimento Composto Anual de 11,5% de 2009 a 2016 (THUSU, 2010).

Fonte: Modificado. Acessado em 25/02/2014. <http://www.sensorsmag.com/specialty-markets/medical/strong-growth-predicted-biosensors-market-7640>. Modificado.

Os biossensores se diferenciam das técnicas já existentes em pelo menos dois pontos fundamentais e muito úteis: o primeiro deles é o íntimo contato do material biológico com um transdutor que tornará o sinal biológico capaz de ser mensurado; e o segundo aspecto é o seu tamanho funcional. A parte sensível de um biossensor é geralmente pequena e permite que volumes muito pequenos de amostras e um mínimo de interferência com os processos existentes após a implementação (THEÂVENOT et al., 1999).

O transdutor que faz o processamento do sinal no biossensor transforma o sinal gerado quando do reconhecimento analito/bioreceptor em um sinal mensurável. Com relação ao princípio de energia envolvida na transdução, os transdutores são classificados em: eletroquímicos baseado em propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade, impedância elétrica, (amperométricos, condutimétricos, potenciométricos e impedimétricos); acústicos, por exemplo, baseados na análise das variações da frequência de oscilação de um cristal piezoelétrico (microbalança de cristal de quartzo, QCM (*Quartz Crystal Microbalance*)) (PAVEY et al., 2003); ópticos, por exemplo, baseados nos fenômenos de ondas evanescentes, SPR, (*Surface Plasmon Resonance*) (TANG et al., 2006) e os calorimétricos os quais usam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para medir a concentração do analito (CHAUBEY, MALHOTRA, 2002).

2.2.1 Biossensores Eletroquímicos

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de grande crescimento, tendo em vista os novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, os quais têm levado a uma busca por sensores com melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (TELES, FONSECA 2008). Os biossensores eletroquímicos consistem de dois componentes - um elemento biológico que reconhece o analito alvo e o transdutor (eletrodo) que "traduz" o evento de bio-reconhecimento em um sinal elétrico útil (IQBAL et al., 2012).

As técnicas eletroquímicas estão entre as mais utilizadas, devido a sua compatibilidade com tecnologias de miniaturização e microfabricação, com baixo custo, e a possibilidade de detecção sem utilização de marcadores. O sinal eletroquímico obtido possibilita relacionar quantitativamente o analito presente na solução (IQBAL et al., 2012).

Há muitos estudos realizados com o intuito de compreender os fenômenos de oxidação e redução de diferentes substâncias envolvidos no processo de adsorção em superfícies e no mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, observadas em muitas aplicações atuais as quais são denominadas técnicas eletroanalíticas. Uma das mais importantes características destas técnicas é que as mesmas possibilitam estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, as técnicas eletroanalíticas são utilizadas na quantificação de espécies de interesse em diferentes áreas de estudo (D'ORAZIO, 2003).

A detecção eletroquímica pode ser amperométrica (medindo-se uma diferença de cargas), potenciométrica (medindo-se uma diferença de potencial), condutimétrica (medindo-se mudanças na condutância entre eletrodos), impedanciométrica (medindo-se mudanças de impedância no eletrodo) (STRADIOTTO et al., 2003; ROSSATO, 2000). No entanto, os biossensores

amperométricos são os mais pesquisados em função de seu relativo baixo custo de construção, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis (ESCAMILLA-GÓMEZ et al., 2008).

Imunossensores são dispositivos analíticos, baseados nos princípios de imunoensaios heterogêneos e nos eventos físico-químicos, resultantes da reação de afinidade antígeno-anticorpo (Ag-Ac) (FERREIRA, YAMANAKA, 2006). A importância dos imunossensores eletroquímicos se deve não somente a alta sensibilidade e seletividade decorrentes do imunoensaio, mas também porque, em termos comparativos, os transdutores eletroquímicos são mais flexíveis quanto à configuração e à miniaturização do dispositivo).

Dentre os tipos de imunossensores eletroquímicos, os amperométricos têm sido os mais utilizados, e se baseiam no princípio da detecção indireta, onde as proteínas são marcadas com enzimas produzindo um composto eletroativo a partir de um substrato adicionado (FREIRE et al., 2003).

2.2.2 Imunossensores Eletroquímicos Amperométricos

Os biossensores amperométricos têm sido hoje uma grande ferramenta de estudo, podendo ser aplicados em diversas áreas, tais como, na indústria, na medicina e no meio ambiente, permitindo monitoramento "*on-line*" da espécie de interesse. Estes biossensores fornecem a possibilidade de se captar um sinal elétrico que seja proporcional à concentração de analito, no eletrodo de trabalho, conseguindo-se assim que a espécie a ser determinada reaja gerando uma corrente. Se esse potencial tiver sido escolhido convenientemente, a intensidade da corrente é diretamente proporcional à concentração (FREIRE et al., 2003).

No transdutor amperométrico a medida de intensidade de corrente, utilizando um potencial fixo, gera uma corrente proporcional à concentração da espécie na superfície do eletrodo (D`ORAZIO, 2003; RICCARDI et al., 2002). O sistema fundamental de medida para biossensores amperométricos é constituído, tipicamente, por três eletrodos: um eletrodo de trabalho, onde ocorrerá a reação, um eletrodo de referência, que regulará o potencial aplicado no eletrodo de trabalho, e um contra-eletrodo o qual fornecerá a corrente ao primeiro (VIEIRA, 2008).

O modo mais comum de um imunossensor eletroquímico está sob a configuração de um ensaio do tipo “sanduíche”. Este pode ser realizado pela imobilização do anticorpo (Ac) ou antígeno (Ag) sobre a superfície eletródica e, após a reação específica com o antígeno ou anticorpo correspondente, é por fim adicionado um anticorpo ou antígeno conjugado a uma enzima (peroxidase, fosfatase alcalina, etc) para o monitoramento da reação catalítica. Outros tipos de ensaios nos biossensores são também empregados como os competitivos diretos ou indiretos, entretanto o ensaio tipo sanduíche proporciona uma alta sensibilidade e especificidade, uma resposta linear para um intervalo de concentração considerável e um curto tempo de reação comparando-se com o ensaio competitivo (RICCARDI et al., 2002).

A característica principal da reação antígeno-anticorpo é a especificidade, representada por uma estreita relação de complementaridade entre os componentes estruturais tridimensionais das duas moléculas. Esta complementaridade concede a aproximação máxima entre os sítios de ligação das moléculas de antígeno, epítomos e o anticorpo. As forças de interação entre as moléculas no complexo antígeno-anticorpo não são covalentes (Van der Waals, ligação eletrostática, ponte de hidrogénio ou ligações hidrofóbicas) e, apesar de individualmente fracas, a multiplicidade das uniões leva a uma energia de coesão significativa. A dissociação do complexo antígeno-anticorpo é reversível podendo ser feita por diferentes processos (calor, modificação do pH, força iônica, solventes orgânicos (SOUZA, KUBOTA, 1999). Os anticorpos podem ser utilizados como reagentes altamente seletivos em biossensores. Na detecção da concentração do antígeno ou do anticorpo, uma vez que são compostos eletroquimicamente inertes, é necessário recorrer-se a outras substância eletroativas. Entre as mais comuns estão as enzimas e íons de metais (MEDYANTSEVA, KHALDEEVA, BUDNIKOV, 2001).

A molécula do anticorpo é composta pelo fragmento F(ab), que possui o grupo amino terminal o qual interage com o sítio de ligação do antígeno, e uma fração Fc, que não interage com o Ag. Portanto, ao propiciar a imobilização pela fração Fc, permite-se uma orientação adequada do anticorpo imobilizado obtendo-se sítios ligantes direcionados para a solução contendo a amostra ou padrão (CHAI et al., 2008) O uso de proteínas que orientem a imobilização dos anticorpos, como a proteína A é ideal sob o ponto de vista do acesso do antígeno

para a reação de afinidade (CHUNG et al., 2006). Isso porque os biocomponentes, quando imobilizados, precisam reter a maior parte de sua atividade biológica, para que o biossensor possa apresentar sensibilidade significativa para o composto alvo (CHEN, DONG, 2003; LEI et al., 2003).

Além dos biossensores amperométricos que utilizam marcadores (*label*) para a detecção do analito como foi visto anteriormente, é possível realizar o monitoramento do analito sem o uso de marcadores (*label free*). Na literatura é crescente o número de trabalhos sem o uso de marcadores (WU et al., 2007; LEE et al., 2007). Essa configuração de biossensor oferece algumas vantagens em relação aos sistemas que utilizam marcadores: como detecção em tempo real, menor custo da análise, redução nas etapas de manipulação e redução nos resultados falso-positivos. Nesses biossensores a detecção é baseada nas mudanças das propriedades elétricas da superfície, por exemplo: aumento na constante elétrica e resistência, na presença da molécula-alvo (DANIELS; POURMAND, 2007; NIRSCHL et al., 2011).

2.2.3 Tecnologia Eletrodos Impressos

A tecnologia de Eletrodos Impressos (EI) tem sido apontada como um método atraente para a produção em massa de sensores, apresentando como vantagens: flexibilidade no *design*, automação no processo, portabilidade, boa reprodutibilidade, uma grande variedade de materiais e custos reduzidos (ALONSO-LOMILLO et al., 2009; FANJUL-BOLADO et al., 2007).

A construção do EI envolve a impressão de tintas em diferentes suportes planares de cerâmica ou plástico. Sua flexibilidade deve-se ao seu elevado número de possíveis modificações. A composição das tintas utilizadas no processo de impressão pode ser modificada pela adição de substâncias de diferentes naturezas, tais como metais, enzimas, polímeros, agentes complexantes, etc (WANG et al 1998; DOMÍNGUEZ, LOMILLO, MARTÍNEZ, et al., 2007).

A utilização, em eletroquímica de eletrodos de ouro modificados por monocamadas auto-montadas (SAM-*Self-Assembled Monolayers*), oferece

vantagens em função de suas propriedades, como por exemplo, a possibilidade de se obter uma estrutura molecular ordenada especificamente orientada, possibilitando otimizar processos de complexação e/ou transferência de elétrons que são importantes no desenvolvimento de sensores químicos. Por outro lado, a alta organização das monocamadas assegura um comportamento homogêneo em toda a superfície do eletrodo, contribuindo para a obtenção de resultados com maior sensibilidade e reprodutibilidade (MIRSKY, 2002).

O desempenho e a confiabilidade dos Els dependem principalmente do sistema de detecção-transdução, do procedimento de imobilização e do material utilizado na sua confecção (CORGIER, MARQUETTE, BLUM, 2005). Um dos principais aspectos dos Els, que os tornam extremamente atrativos quando se busca o desenvolvimento de sensores comerciais, é a possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, todos impressos no mesmo suporte. Esta característica, associada à simplicidade de elaboração e às inúmeras possibilidades de modificação dos Els, coloca a técnica numa posição privilegiada entre as demais (DIAS et al., 2013, SILVA et al., 2013).



Figura 15: Esquema do eletrodo impresso de ouro. E.A. (Eletrodo Auxiliar), E.T. (Eletrodo de trabalho) e E.R. (Eletrodo de Referência).

Fonte: O autor

2.2.4 Técnicas Eletroquímicas

A eletroquímica surgiu como uma ferramenta para diversos tipos de análises e posteriormente associada a uso dos biossensores. A eletroquímica refere-se a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que pode ocorrer homogeneamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo (LOWINSOHN et al., 2006).

As técnicas eletroanalíticas possuem vantagens quando comparadas às técnicas tradicionais. Dentre elas a possibilidade, na maioria das vezes, de análises diretas da amostra sem requerer etapas de separação, pré-tratamento e a utilização de marcadores (POWER; MORRIN, 2013). Outro aspecto que deve ser ressaltado com relação à eletroquímica quando comparada à química convencional é a não utilização de grandes quantidades de reagentes nas análises eletroquímicas (JUSTINO et al., 2010).

As diversas técnicas eletroquímicas são: voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial.

2.2.4.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica consiste em um grupo de métodos eletroanalíticos cujas informações sobre a concentração do analito são oriundas das medidas de corrente em função do potencial aplicado sob condições de completa polarização do eletrodo de trabalho, por meio de microeletrodos (KIMMEL et al., 2012). É uma técnica de varredura reversa do potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo se modifica em uma velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final esperado, a varredura é revertida ao valor inicial, com a mesma velocidade (LINDINO et al., 2006). Para a realização da técnica, é necessário um potenciostato com gerador de programa de potencial, conectado a um computador para registrar os gráficos de corrente em função do potencial, de uma célula convencional de três eletrodos e uma solução contendo o analito e eletrólito suporte. Obtém-se, como resposta a essa perturbação, por exemplo, um par de picos, catódico e anódico. Para conseguir isso, aplica-se uma voltagem chamada onda triangular à célula

eletrolítica (Figura 17). O resultado dessa perturbação, consiste em um par de picos, catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}) .

Os parâmetros eletroquímicos mais importantes, são os potenciais de picos catódicos e anódicos (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de picos catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) ou pico de meia altura ($E_{p/2}$). É possível também avaliar processo eletródico, na dependência do potencial e da corrente com a variação da velocidade de varredura, com a concentração da substância eletroativa mediante a adição de eletrófilos ou prótons, com análise baseada em testes de diagnósticos. Assim sendo são obtidas informações importantes de reversibilidade e irreversibilidade e do processo de transferência de elétrons, da presença de reações químicas acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, bem como é possível caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico (REIS et al., 2009). Em geral o próprio formato da onda é que indica o processo reversível; presença de um par de picos (catódico e anódico) de mesma altura, com potenciais de picos separados por uma distância de $59/n$ mv (caso as espécies oxidadas e reduzidas sejam estáveis). O espectro eletroquímico de um sistema irreversível mostra a completa inexistência de pico reverso (GRIESHABER et al., 2008).

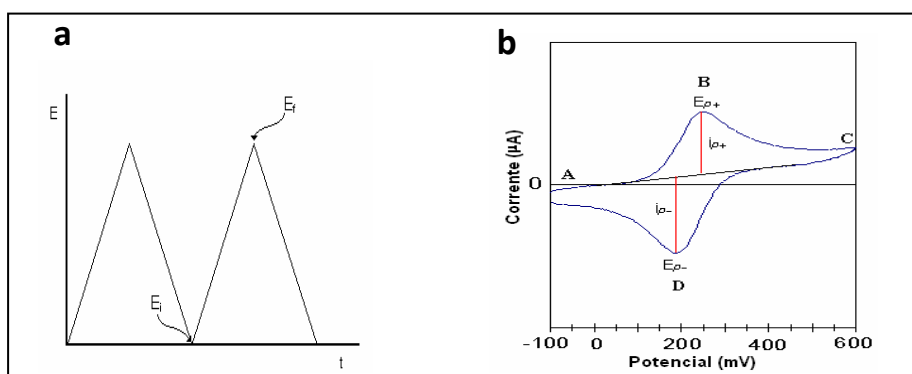


Figura 16. Técnica da VC. (a) Relação potencial-tempo e (b) Resposta obtida da perturbação aplicada.

Fonte: GREEF et al., 1985.

2.2.5 Monocamadas Automontadas - SAM

A formação de SAM tem sido uma alternativa bastante atraente de procedimento de modificação de superfícies eletródicas para a imobilização de material biológico, devido à sua simplicidade, versatilidade e possibilidade de produzir estruturas altamente ordenadas. (JIN et al., 2002).

Existem basicamente três diferentes abordagens por meio das quais as SAMs têm sido desenvolvidas e aplicadas em eletroanalítica. Elas podem ser classificadas de acordo com o mecanismo de fixação da monocamada sobre o eletrodo sólido. O primeiro tipo de SAM sobre eletrodos sólidos foi descrito por Sagiv em 1979, que realizou a formação de monocamadas organizadas via o processo de silanização. A segunda abordagem para a confecção de SAM está relacionada com a técnica de *Langmuir-Blodgett* (LB) e envolve a formação de membranas lipídicas sobre os eletrodos sólidos. Por fim, a que tem crescido constantemente no decorrer dos últimos anos é a formação de SAM que faz uso da adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas ordenadas (FREIRE et al., 2003).

As SAM empregam camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são constituídas espontaneamente como consequência da adsorção da imersão de uma superfície sólida (Au, Ag, Cu) em solução formada por moléculas anfóteras (derivados alquil, álcoois, aminas e tióis). A adsorção das moléculas anfóteras também pode ser feita por deposição em vapor, entretanto neste caso o controle da estrutura é mais difícil. Em detrimento de uma grande variedade de alcanos funcionalizados e de superfícies metálicas terem sido estudadas, o grupo mais utilizado e descrito é, indubitavelmente, de tióis sobre superfícies de ouro (CHAKI, VIJAYAMOHANA, 2002). A automontagem de tióis no ouro deve-se à forte interação química entre o átomo de enxofre (S) e a superfície do ouro (FREIRE et al., 2003).

Este tipo de formação de SAM envolve uma adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas, devido à ligação RS-Au ser extremamente forte e estável, resultando na obtenção de uma estrutura molecular ordenada, especificamente orientada (Figura 17). Além disso, a capacidade do

uso de tióis com diferentes grupos funcionais torna possível o desenvolvimento de superfícies com propriedades e funções distintas, viabilizando interações quase específicas entre a superfície eletródica e o material biológico, com alto grau de controle sobre sua arquitetura molecular (FREIRE et al., 2003).

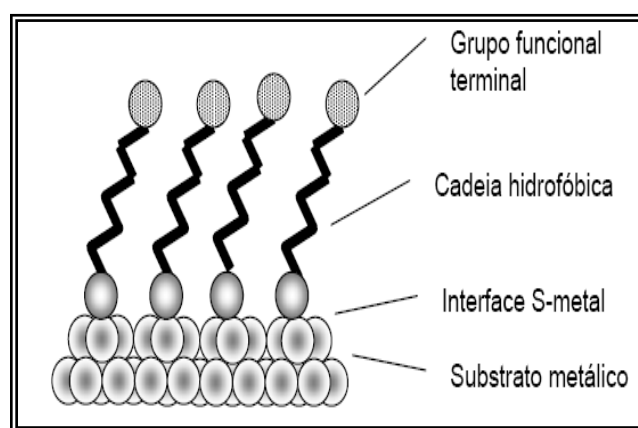


Figura 17: SAM - MONOCAMADAS AUTOMONTADAS de alcanotiol formada sobre uma superfície de ouro. Os elementos que compõem a SAM estão em destaque.

Fonte: FREIRE, et al., 2003. Copiado. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422003000300016&script=sci_arttext. Copiado.

2.2.5.1- Ácido Tioglicólico

Os Tióis estão entre as substâncias empregadas com êxito para modificação de superfícies metálicas e de semicondutores. Dentre os metais ressalta-se o ouro com o qual reagem quimicamente formando ligações muito estáveis (KRÓLIKOWSKA et al., 2003).

Ácido tioglicólico (TGA, do inglês *thioglycolic acid*- Figura 18) é o composto orgânico $\text{HSCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, contendo um grupo tiol(mercaptano) e um ácido carboxílico. É facilmente oxidado pelo ar ao dissulfeto correspondente $[\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{H}]_2$. O grupo tiol do ácido tioglicólico e seus derivados formam ligações

fortes com cátions metálicos e esse aspecto estrutural tem levado à aplicação desses compostos em vários ramos da química (SOUSA et al.,2007).

O TGA ao longo dos anos vem sendo apontado como uma boa âncora para imobilização covalente de biomoléculas. É utilizado para a fixação de biomoléculas através de fortes interações eletrostáticas (Li et al 2011) com as superfícies metálicas em biossensores eletroquímicos (ZHANG et al., 2012). Tendo em vista a manutenção da atividade de biomoléculas a imobilização orientada da molécula alvo é de extrema importância. O método mais completo para tal imobilização em eletrodos deve ser por meio de acoplamento covalente, onde as biomoléculas são ancoradas através dos seus terminais (ZHAO et al, 1999; YE et al., 2003).

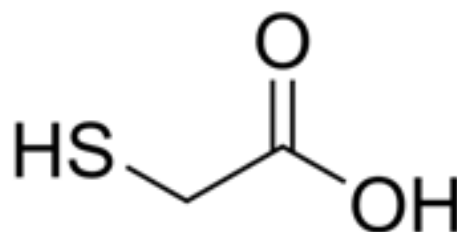


Figura 18: Estrutura química do ácido tioglicólico.

Fonte: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1101.html>

3 OBJETIVOS

3.1. Geral:

Avaliar a atividade inflamatória em pacientes portadores de artrite reumatoide em tratamento com DMARDs e terapia biológica, através das citocinas IL-6, IL-10, a frequência da IgG do Parvovírus B19 e desenvolver imunossensor eletroquímico para anti-citrulina (anti-CCP),

3.2. Específicos:

Nos pacientes com artrite reumatóide para avaliação da atividade inflamatória

- Estimar a frequência de IgG anti-PVB19;
- Correlacionar os níveis de IL-6, IL-10 com a atividade inflamatória mediante os ICADs (HAQ, DAS28, CDAI, EULAR, EVA, PCR e VSH) em pacientes em tratamento com DMARDs e terapia biológica;
- Correlacionar a frequência de IgG anti-PVB19 com a atividade inflamatória segundo o critério EULAR (DAS28: engloba VSH, juntas edemaciadas, dolorosas e EVA).

Para o desenvolvimento do imunossensor

- Modificar a superfície do eletrodo de ouro impresso através da SAM;
- Caracterizar as respostas eletroquímicas amperométricas através da técnica de voltametria cíclica;
- Estabelecer a curva de calibração do imunossensor para detecção do anti CCP em eletrodos que não soamostras limpas.

4 RESULTADOS

Os resultados são apresentados em forma de artigos científicos

1º artigo: Association IL-6 levels and parvovirus B19 IgG frequency with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis.

Maria Helena Queiroz de Araújo Mariano, Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahú, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, Eliézer Rushansky, Samuel Kosminsky, Mízia Maria Sabóia da Silva, Rosa Amália Fireman Dutra.

Artigo original submetido ao periódico: ***Clinica Chimica Acta***
Qualis B1 da CAPES

2º artigo: Anti-Cyclic Citrullinated Peptide: A Biosensor for Rheumatoid Arthritis:

Mariano, M.H.Q.A.; Silva, M.M.S., Saade, J.; Rushansky, E.; Dutra, R.F.

Short communication submetido ao periódico: ***Clinica Chimica Acta***
Qualis B1 da CAPES

5 ARTIGO 1

Adding ORCID to Co-Authored submission

Entrada x



Clinica Chimica Acta <esubmissionsupport@elsevier.com>
para mim

19:11 (Há 1 hora) ☆



inglês ▾

> persa ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#)

Dear Dr. Maria Helena Queiroz de Araújo Mariano,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Clinica Chimica Acta

Corresponding Author: Maria Rosângela Coêlho

Co-Authors: Maria Helena Queiroz de Araújo Mariano; Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahu; Eliézer Rushansky; Samuel Kosminsky; Mízia Maria Sabóia da Silva; Rosa Amália Fireman Dutra

Title: Association of IL-6 levels and parvovirus B19 IgG frequency with clinical disease activity in rheumatoid arthritis patients

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at rcoelholika@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/cca/!asp?i=65408&l=FVT5WK32>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Clinica Chimica Acta

Association of IL-6 levels and parvovirus B19 IgG frequency with clinical disease activity in rheumatoid arthritis patients

Maria Helena Queiroz de Araújo Mariano^{a,b}, Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahú^{c,d}, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{d,e}, Eliézer Rushansky^b, Samuel Kosminsky^f, Mízia Maria Sabóia da Silva^a, Rosa Amália Fireman Dutra^a

^a Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Rheumatologist of Functional Unit of Rheumatology- Oswaldo Cruz University Hospital / University of Pernambuco, Rua Arnóbio Marquês, 310 - Santo Amaro, 50100-130, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences (CCS), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Virology Division, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

^e Departament of Physiology and Pharmacology, Center for Biological Sciences (CCB), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

^f Rheumatologist - Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

Address correspondence to: Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, Virology Division, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal Universidade of Pernambuco, University Campus, District: Cidade Universitária, Post Office Box: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail: rcoelholika@gmail.com, Telephone: (+55 81) 2126-8527

Abstract

Background: Rheumatoid Arthritis (RA) is a common, chronic, idiopathic autoimmune disease with over 4 million people worldwide that is associated with progressive disability, early death, and socioeconomic costs.

Objective: Determine the IL-6 levels and parvovirus B19 IgG frequency in rheumatoid arthritis (RA) patients on DMARDs alone and on biologic agents (with or without a DMARDs), correlating with the clinical activity.

Methods: 83 RA patients were assessed using validated clinical disease activity tools: Health Assessment Questionnaire (HAQ), standard 28-joint Disease Activity Score (DAS28), Clinical Disease Activity Index (CDAI), visual analogue scale (VAS), 28-joint count and acute phase proteins (CRP, ESR). Samples were evaluated for the presence of parvovirus B19 IgG (Virion\Serion, Germany) and measured the IL-6 (Invitrogen) serum levels by ELISA.

Results: Significant correlations were found between serum levels of IL-6 and clinical measures of disease activity in patients on biologics agents by Spearman coefficient. The parvovirus B19 IgG frequency was 73% and a greater number of patients were among individuals with moderate and high inflammatory activity (EULAR).

Conclusions: A significant correlation between serum levels of IL-6 and clinical measures disease activity in patients with RA treated with biologic agents suggests a role of IL-6 levels as a disease activity marker for the clinical practice.

Keywords: Rheumatoid Arthritis; Interleukin-6 (IL-6); Parvovirus B19 IgG

1. Introduction

Rheumatoid Arthritis (RA) is a common, chronic, idiopathic autoimmune disease with over 4 million people worldwide that is associated with progressive disability, early death, and socioeconomic costs. RA is a multifactorial disease, with a prevalence of approximately 1% and an incidence of 5–50 per 100,000 per year with three times more female than male patients [1-4].

This illness is driven by interaction of multiple inflammatory and anti-inflammatory cytokines, such as IL-1, TNF- α , IL-6 whose expression in synovial membrane is likely to be of greater significance to the pathogenesis of RA, as this is the principal site of immune and inflammatory activity [5-6].

Is possible that virus may trigger the onset of rheumatoid arthritis in subject genetically susceptible. As the presence of human parvovirus B19 DNA in synovial fluid, synovial cells, and/or synovial tissue of RA patients supporting a role for parvovirus B19 in the RA's etiopathogenesis. Although, the role for microorganisms as initiating factors of RA remains controversial [7].

Disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) such as methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine, have been shown to significantly slow the joint destruction and reduce or sometimes prevent disability. More recently, biologic agents, usually in combination with one or more DMARDs, were shown to be even more effective than the DMARDs used alone. The biologic agents used in RA are those that target tumour necrosis factor- α (TNF- α), including infliximab, etanercept, adalimumab and rituximab which is a monoclonal antibody directed against cell surface protein CD20 (anti-CD20) [8].

The most widely used indexes for assessment of disease activity in rheumatoid arthritis are Health Assessment Questionnaire (HAQ), standard 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and Clinical Disease Activity Index (CDAI) [9].

The aim of the present study was to determine the IL-6 serum levels and frequency of parvovirus B19 IgG in patients with RA on DMARDs alone and on biologic agents (with or without a DMARDs), correlating with the clinical activity.

2. Methods

2.1. Study population

This cross-sectional study with 83 patients with AR from both sexes, treated with biologic agents (adalimumab, etanercept, infliximab and rituximab) and/or one DMARDs (methotrexat, leflunomide and hidroxicloroquine) of attending at the Imunnobiologic Center of the University of Pernambuco / Oswaldo Cruz Hospital and were recruited between Abril 01, 2013 and May 05, 2013.

This study was approved by the research committee of the University of Pernambuco (protocol number 0161.0.106.000-009), and was performed according to the World Medical Association Declaration of Helsinki.

2.2. Clinical and laboratorial data collection

After written consent was obtained from the patient, demographic data were collected and a single member of the study group performed the clinical assessments on all patients. Each patient completed a Health Assessment Questionnaire (HAQ), marked patient global disease activity on a 10 cm visual analogue scale (VAS) and the recruiter performed a 28-joint count. Scores were calculated for the validated clinical disease activity tools (CDATs): HAQ [10], DAS28 [11], CDAI [12] and the European League Against Rheumatism (EULAR) classification of disease activity (low disease activity: DAS28b3.2, moderate disease activity: DAS28 between 3.2 and 5.1, high disease activity: DAS28 [14]. The variables studied included age, gender and disease duration.

Whole blood and plasma specimens were collected and the patients were tested for erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CPR-lower reportable limit of 6 mg/L) by latex agglutination.

2.3. Determination of IL-6 levels and parvovirus B19 IgG

Peripheral blood samples of 10 mL were collected by venipuncture in a tube without anticoagulant. Serum was obtained by centrifugation and stored at -80°C until measurement by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the Human IL-6® Kit (Invitrogen) and the Parvovirus B 19 IgG® (Virion\Serion, Germany), all procedures according to the manufacturer's instructions.

2.4. Statistical analysis

The Stata, software was used for statistical analysis of data. Spearman's rank correlation coefficients were calculated to determine correlations between clinical measures and cytokine levels. The Mann–Whitney Rank Sum test was used to compare non-parametric values (ESR, CRP and cytokine levels) between patients on biologic agents and those on DMARDs alone. Cytokine and clinical measures compatibles with a normal distribution were compared among the three different EULAR groups using one-way ANOVA. A similar comparison for non-normal measures was performed using one –way ANOVA on ranks (Krusal –Wallis test). Statistical significance was set at $p < 0.05$. The Fisher's exact test was used to describe the distribution of patients correlating the parvovirus B19 IgG seropositive with inflammatory activity by EULAR.

3. Results

3.1. Clinical characteristics

This study enrollment 83 individuals (5 males and 78 females, with an age range of 37–77 years), of whom 41 patients were on biologic agents (with or without a DMARDs), and 42 on DMARDs alone. The clinical parameters from individuals with rheumatoid arthritis are depicted in table 1.

Table 1- Clinical characteristics from the individuals with rheumatoid arthritis.

	Mean	(Range)
Disease duration (years)	13.4	(1-40)
Swollen joint count (range 0–28)	8.7	(0-16)
Tender joint count (range 0–28)	7.8	(0-16)
HAQ	1.6	(0-8.8)
DAS28	4.6	(1-7.5)
CDAI	27.7	(3-49)
CRP N (%)	55	(66.3%)
Biologics (±DMARDs), N (%)	41	(49.4%)
Etanercept	6	
Adalimumab	5	
Infliximab	18	
Rituximab	8	
DMARDs alone, N (%)	42	(57.8%)
Methotrexate	28	
Leflunomide	5	
Methotrexate and Leflunomide	10	
Hidroxicloroquine	3	

3.2. Correlation between clinical disease and IL-6 levels

The table 2 shows the correlation between serum levels of IL-6 and clinical disease activity, independent of the treatment type.

Table2- Correlation between serum levels of IL-6 and clinical disease activity, independent of the treatment type, in individuals with rheumatoid arthritis.

	HAQ	DAS28	CDAI	VAS	CRP (mg/L)	ESR (mm/h)	Swollen joints	Tender joints
IL-6 levels	0.116	0.278	0.255	0.261	0.284	0.336	0.134	0.234
$p < 0.05$	(0.296)	(0.011)	(0.020)	(0.017)	(0.009)	(0.002)	(0.227)	(0.033)

In the group of patients on biologic agents (n=41), significant correlations were found between IL-6 levels and the measures of clinical disease activity, as follows: HAQ ($r= 0.309$, $p= 0.050$); DAS28 ($r= 0.663$, $p= 0.000$); CDAI ($r= 0.503$, $p= 0.001$); CRP ($r= 0.568$, $p= 0.000$); VAS patient ($r= 0.531$, $p= 0.000$); ESR ($r= 0.603$; $p= 0.000$); tender joints ($r= 0.437$, $p=0.004$).

In regard the group of patients on DMARDs alone (n=42), no significant correlations was found between IL-6 levels with the measures of clinical disease activity.

3.3. IL-6 levels and parvovirus B19 IgG in according to EULAR

When all the patients were grouped according to EULAR (DAS 28), a significant increase was found in the levels of IL-6 with high inflammatory activity. Table 3 shows the comparison between the median cytokines levels and the three EULAR groups, according to EULAR classification of disease activity.

Table 3-Median cytokine levels according to EULAR in individuals with rheumatoid arthritis.

	EULAR			<i>p</i> value
	Low activity* Median (Q1,Q3) n=14	Moderate activity* Median (Q1,Q3) n=39	High activity* Median (Q1,Q3) n=30	
IL-6 levels	2.93 (0.00, 6.82)	0.00 (0.00, 4.56)	3.61 (0.40, 19.10)	0.010

"low" disease activity: DAS28<3.2, "moderate" activity: DAS28 between 3.2 and 5.1, "high" activity: DAS28>5.1.

The overall frequency of parvovirus B19 IgG was 73% (60/78) in individuals with rheumatoid arthritis. Table 4 shows the distribution on patients positive and negative for parvovirus B19 IgG, according to EULAR classification of disease activity.

Table 4 Seropositivity for parvovirus B19 IgG according to EULAR classification of disease activity.

Anti-B19 IgG	EULAR			Total
	Low activity*	Moderate activity*	High* activity*	
Positive, n (%)	14.7 (10/n)	33 (48.5)	25 (36.8)	68 (100.0)
Negative, n (%)	3 (30.0)	5 (50.0)	2 (20.0)	10 (100.0)
Total, n (%)	13 (16.7)	38 (48.7)	27 (34.6)	78 (100.0)

**"low" disease activity: DAS28<3.2, "moderate" activity: DAS28 between 3.2 and 5.1, "high" activity: DAS28 >5.1. Fisher's exact test: $p > 0.05$.

4. Discussion

Considering the important activity of pro-inflammatory cytokines as mediators of joint inflammation in RA [14], this study represents the first report of the association between clinical measures assessing inflammatory activity and serum levels of IL-6 in Brazilian subjects.

It is known that IL-6 induces the production of hepatic acute-phase proteins, including CRP [15-17]. Our data is consistent with some studies that found significant correlations between IL-6 levels and ESR, CRP [18] and the disease activity [19].

The IL-6 levels have been associated with high inflammatory activity according the most widely used indexes for assessment of disease activity in rheumatoid arthritis are Health Assessment Questionnaire (HAQ), standard 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and Clinical Disease Activity Index (CDAI) [10]. Our data corroborate the other studies which the authors found similar correlations in a cross-sectional study of a heterogeneous group of RA patients [20] and correlations between IL-6 levels and ESR, CRP and DAS28 [21].

In the group of patients on biologic agents, the correlations were significant between IL-6 levels and the same measures of clinical disease activity. In the most biological group made use of infliximab. This study is consistent with some sources that showed reduction of IL-6 levels with infliximab [22]. However, this study did not showed correlation between the IL-6 levels and swollen joints, but was found with the tender joints. This association might be explainable by many patients that progress to secondary osteoarthritis (OA), justifying the tender symptoms without swollen [23].

And in the group of patients on DMARDs, no correlations was found between serum levels of IL-6 and the measures of clinical disease activity data, as also described by Milman et al. [20]. Some studies showed reduced levels of IL-6 with leflunomide and methotrexate [24,25]. This study was a cross-sectional study, thus the IL-6 levels in response to therapy was not possible to assess.

Regards the frequency of parvovirus B19 IgG describe in several studies, as a case-control study that found highest of parvovirus B19 IgG, when compared with controls of patients with osteoarthritis [26-29]. The development of NS1-specific IgG is associated with chronic arthritis and other severe courses of B19 infection [30]. These data suggest a possible role of parvovirus B19 in RA.

An interesting point that emerged from this research was a high frequency of individuals positive for parvovirus B19 IgG in the group of moderate inflammatory activity (EULAR), nevertheless all subjects were on immunosuppressive drugs. As some studies demonstrated that the presence of parvovirus B19 in synovial fluid and membrane of immunosuppressed RA patients could worsening the disease [28].

In summary, this study provide further information regarding the association between clinical measures assessing inflammatory activity and serum levels of IL-6 in Brazilian subjects with RA. Additionally, follow investigations are required to evaluate the role of parvovirus B19 in RA.

References:

- [1] Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85:307-10.
- [2] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423:356-61.
- [3] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376:1094–1108.
- [4] Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;24:733–745.
- [5] McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365:2205-2219.

[6] Kokkonen H, Soderstrom I, Rocklov J, Hallmans G, Lejon K, Dahlqvist SR. Up-Regulation of Cytokines and Chemokines Predates the Onset of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:383–391.

[7] Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010;35:10-14.

[8] Can Pharm J (Ott). 2014 Mar;147(2):97-109. Practice guidelines for pharmacists: The pharmacological management of rheumatoid arthritis with traditional and biologic disease-modifying antirheumatic drugs. Bornstein C, Craig M, Tin D.

[9] Milmana N, Karsha J, Boothra RA. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2010;43:1309–1314.

[10] Bruce B, Fries JF. The health assessment questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol* 2005;23.5: S14.

[11] Kirwan J. Measures of Rheumatoid Arthritis Disease Activity. *J Rheumatol* 2009;36.2:442-442.

[12] Aletaha D, Nell VPK, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R796–806.

[13] Jennifer HH, Symmons DPM. Postpublication validation of the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: where do we stand? *Curr Opin Rheumatol* 2013;25.2:157-163.

[14] Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2008;118.11:3537-45.

[15] Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265.3:621.

[16] Robak T, Gladalska A, Stepień H, Robak E. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 1998;7.5:347-53.

[17] Dayer JM, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49.1:15-24

[18] Usón J, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Cabezas JA, Gonzalez-Tarrio JM, Martín-Mola E, Fontan G. Soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 levels

in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies. *J Rheumatol* 1997;24.11:2069-75.

[19] Helal A, Moneim H., et al. Fatigue in rheumatoid arthritis and its relation to interleukin-6 serum level. *The Egyptian Rheumatologist* 2012;34.4:153-157

[20] Nataliya M, Karsh J, Booth RA. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2010;43.16:1309-1314.

[21] Masi AT, Rehman AA, Elmore KB, Aldag JC. Serum Acute Phase Protein and Inflammatory Cytokine Network Correlations: Comparison of a Pre-Rheumatoid Arthritis (pre-RA) and Non-RA Community Cohort. *J Innate Immun* 2013;5.2:100-13.

[22] Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF α therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?. *Annu Rev Immunol* 2001;19.1:163-196.

[23] Cunha BM, Oliveira SB, Santos-Neto L. Incidence of infectious complications in hip and knee arthroplasties in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rev Bras Reumatol* 2011;51.6:609-615.

[24] Van Roon EN, Jansen TL, Mourad L, et al. Leflunomide in active rheumatoid arthritis: a prospective study in daily practice. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58.2: 201-208.

[25] Shenoy BS. An evaluation of the changes in the plasma levels of cytokines in rheumatoid arthritis patients on methotrexate therapy. Dissertation (Doctor of Medicine in Pharmacology) – Rajiv Gandhi University of Health Sciences, Karnataka, Bangalore. 2006.

[26] Cohen BJ, Buckley MM. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J Med Microbiol* 1988;25.2:151-153.

[27] Takahashi Y, Murai C, Shibata S, Munakata Y, Ishii T, Ishii K, Saitoh T, Sawai T, Sugamura K, Sasaki T. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;95.14:8227-8232.

[28] Kerr JR, Cartron JP, Curran MD, Moore JE, Elliott JR, Mollan RA. A study of the role of parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995;34.9:809-813

[29] Santos RLS. Influence of Human Parvovirus B19 Infection in Rheumatoid Arthritis. 2008. 73 f. Dissertation (Master in Tropical Medicine - Center of Health Sciences) – Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2008.

[30] Tzang BS, Tsai CC, Tsay GJ, Wang M, Sun YS, Hsu TC. Anti-human parvovirus B19 nonstructural protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis. Clin Chim Acta 2009;405.1: 76-82.

6 ARTIGO 2

**Gregory Makowski** gmakowski@clpct.com eesmail.elsevier.com 21 de jan (9 dias atrás) ☆
para mham62, mim

 inglês > português [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#)

Dear Dr.Med. maria helena queiroz de araujo mariano,

Your submission entitled "Anti-Cyclic Citrullinated Peptide: A Biosensor for Rheumatoid Arthritis." has been received by Clínica Química Acta

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/cca/>.
Your username is: mham62@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/cca/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Clínica Química Acta

Anti-Cyclic Citrullinated Peptide: A Biosensor for Rheumatoid Arthritis.

Mariano, M.H.Q.A.; Silva, M.M.S., Saade, J.; Rushansky, E.; Dutra, R.F.

Abstract

A label-free electrochemical immunosensor was developed for detecting anti-cyclic citrullinated protein (anti-CCP) antibodies which are important biomarkers for rheumatoid arthritis (RA). Screen-printed gold electrodes immersed in Thioglycolic acid (TGA) solution resulted in modified monolayers and NHS was used to activate the carboxylic acid groups appropriate for peptide coupling. The stepwise modification was characterized by cyclic voltammetry in a potential range from -0.4 to +0.8 V and at a scanning rate of 50 mV s⁻¹. The calibration curve shows a linear response from (anti-CCP) 10 to 100 ng mL⁻¹ and a good correlation coefficient of 0.981. The detection limit (0.303 ng mL⁻¹ anti-CCP) was lower when compared with traditional analytical methods. This immunosensor provides a simple and cost-effective way to develop a point-of-care system, and thus is a promising tool for diagnostic and prognostic RA evaluation.

Keywords: immunosensor, anti-CCP, rheumatoid arthritis.

1. Introduction

Current diagnosis of Rheumatoid Arthritis (RA) is based on the presentation of clinical features, supported by X-rays and a set of molecular markers including autoantibodies (Drouvalakis et al., 2008). Besides the detection of the rheumatoid factor antibody (e.g., IgM, IgG, or IgA), which was first cited in 1922 (Dörner, Egerer, Feist, Burmester, 2004), recent studies have shown the relevance of autoantibodies to citrullinated peptides (citrulline-containing peptides) in RA (Taylor, Gartemann, Hsieh, & Creeden, 2011; Zintzaras, Papathanasiou, Ziogas, & Voulgarelis, 2012). Accordance with recent research, disease activity and gravity tends to increase where the test result is positive anti-CCP (Kim; Kim, 2012).

Over the last few years, different analytical tools have been shown to enable the reliable detection of different citrullinated proteins or peptide receptors in RA (van Venrooij, van Beers, & Pruijn, 2011). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were developed to measure these antibodies. (Aggarwal, Liao, Nair, Ringold, & Costenbader, 2009; dos Anjos et al., 2009; van Gaalen, Visser, & Huizinga, 2005) These methods are time consuming, labor-intensive, expensive, and need to be performed by skilled personnel.

Electrochemical immunosensors have gained growing attention because they combine the high specificity of traditional immunoassay methods with the low detection limits and low expense of electrochemical measurement systems. Label-free immunosensors using voltammetric techniques such as differential cyclic voltammetry (CV) have been described. Recently, the screen printed electrode (SPE) has demonstrated promising potential, especially in the development of rapid analysis and biosensor fabrication (Xu, Zhang, Chen, Kong, 2009). Different types of electrodes have been used by a number of investigators to determine various analytes with high sensitivity and specificity (PIERMARINI, MICHELI, AMMIDA, PALLESCHI, MOSCONE, 2007).

Thiols are among the most successfully employed chemicals for a modification of metal and semiconductors surfaces because they react chemically with gold, forming very stable metal–sulphur covalent bonds (KRÓLIKOWSKA et al., 2003). Thioglycolic acid, also known as mercaptoacetic acid, is successfully

used for attachment of biomolecules to nanoparticles surfaces for electrochemical biosensors (Zhang et al 2012). Nanoparticles surfaces stabilized with TGA can form strong electrostatic interactions with proteins and other biomolecules (LI et al., 2011).

In this work, we describe the preparation and characterization of a simple label-free immunosensor method for the detection of anti-CCP. A thioglycolic acid (TGA) film was deposited onto a screen-printed gold electrode surface for the purpose of attaching the cyclic citrullinated peptide (CCP). The method developed in this paper is a potential candidate for sensitive and rapid detection of anti-CCP, which would allow the early diagnosis of RA.

2. Materials and Methods

A Ac policlonal de coelho anti Histone H3 (citrulline R26), and Histone H3 peptide - citrulline R26, were purchased from Abcam (USA). TGA, N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC), potassium chloride (KCl, 99.5%), potassium ferrocyanide ($K_4Fe(CN)_6$), and potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), were purchased from Sigma–Aldrich (USA). The ultrapure water (18 M Ω cm) used to prepare all the solutions was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Inc., Billerica, USA).

Screen-printed gold electrodes (SPE — model 220AT) were purchased from Dropsens (Spain). The electrodes are composed of a gold working electrode, which presents a 2 mm² active area, a gold counter electrode, and a silver reference electrode. Electrochemical measurements were performed in an Ivium potentiostat (Ivium Technologies, Netherlands) coupled to a microcomputer and controlled by the Ivium Soft software. An equimolar ferrocyanide/ferricyanide mixture (5 mM) in 0.1 M KCl solution was used for electrochemical measurements. For the voltammetric measurements, a potential range from -0.4 to +0.8 V was applied with a scanning rate of 50 mV s⁻¹. All steps were performed at room temperature.

The gold electrode was rinsed with deionized water and ethanol, and immediately immersed in a 0.01 mol L^{-1} TGA solution for about 18 h at room temperature in the darkness. The resulting monolayer-modified electrode was thoroughly rinsed with water to remove physically-adsorbed TGA. After the deposition of the TGA film, 40 mmol L^{-1} of EDC and 20 mmol L^{-1} of NHS was used to activate the carboxylic acid groups which are appropriate for peptide coupling. An aliquot of CCP was dripped onto the SAM/SPE surface for 1 h at room temperature and then the electrode was washed with distilled water. The CCP/SAM/SPE was incubated in 0.05 mol L^{-1} of glycine solution for 45 min to block possible remaining active sites of the TGA layer for the non-specific absorption (Scheme 1). When not in use, the glycine/CCP/SAM/SPE were stored in a moist chamber in a refrigerator (approximately $+4^{\circ}\text{C}$). The resulting immunosensor was incubated for 30 min in anti-CCP solutions with concentrations varying from $2 \text{ }\mu\text{g/mL}$ to $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$.

3. Results and Discussion

The results of this study suggest that the immunosensor system is a promising platform for immunological routines — the expectation of being able to convert an existing established ELISA assay to a more rapid test format was achieved.

For the detection of anti-CCP antibodies, some biosensor have been reported (Villa et al., 2011) in relation to the fabrication and performance of multi-walled carbon nanotube polystyrene-based electrochemical transducers for detecting anti-CCP antibodies in RA patients, but the current differences between borderline serum and control serum are not so significant. Drouvalakis et al. (2008b) demonstrated a single-walled carbon nanotube immunosensor using a quartz crystal microbalance (QCM) sensing crystal for the direct assay of human RA serum and they reported that the nanotube-based sensor is significantly more sensitive than the established ELISA. Lokate, Beusink, Besselink, Pruijn, & Schasfoort (2007) used surface plasmon resonance (SPR) microarray imaging to

measure the presence of anti-citrullinated protein antibodies in the serum of RA. Table 1 shows some immunosensor references for the detection of anti-CCP.

In this study, we observed a better performance compared to previous studies. Villa et al., 2011 developed a biosensor with peroxidase, which increases both the time and cost. The QCM system requires more time and a greater amount of reagent, as was observed in the study by Drouvalakis et al., 2008 whereas the label-free sensors are faster and require only small quantities of reagents. The SPR system of Lokate et al., 2007 is more costly and it is not possible to use the miniaturized biosensor for point-of-care testing, which is contrary to the methodology used in this study.

3.1 Preparation of the immunosensor.

The schematic diagram of the anti-CCP immunosensor fabrication is presented in Fig. 1a. First, a monolayer of TGA was formed on the electrode surface through the strong Au–thiolate bond. To provide high sensitivity and good measurement repeatability, it is important to find suitable linker compounds to enable the packing of a high-density peptide onto the electrode surface. Therefore, the next step is the activation of the SAM by the formation of NHS ester in the NHS–EDC solution. After this, the active NHS esters were replaced by the primary amines of the antibody, and the antibody was thus immobilized through the amide bond. Finally, a specific binding event occurred between the immobilized CCP peptide and the anti-CCP. Cyclic Voltammetry can provide useful information about the changes of the electrode behavior after each assembly step. As shown in Fig. 2, the redox probe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ reveals a reversible cyclic voltammogram at a bare Au electrode (curve a). After the pretreated Au electrode was covered with short-chain thiols (TGA), the permeability of ions through it was so high that the redox probe could not penetrate in and, therefore, the response current decreased (curve b). When peptide macromolecules were immobilized on the Au-SAM, the penetration of the redox probe was reduced and, consequently, the response current decreased (curve c). After the binding of anti-CCPs to the

immobilized peptide, the penetration of the redox probe was further reduced (curve c).

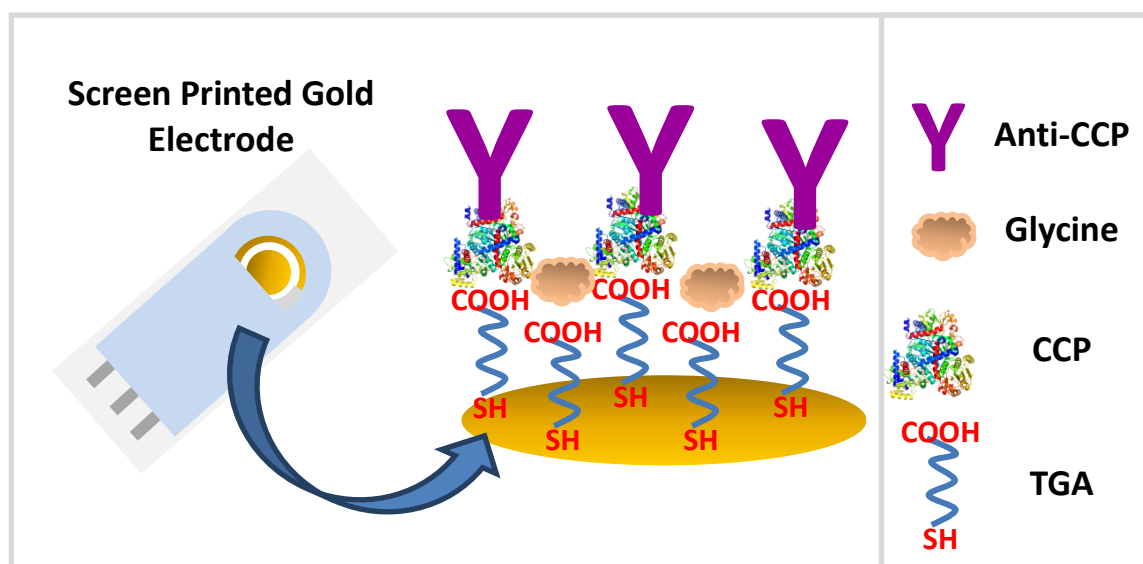


Figure 1: Schematic illustration of the stepwise preparation of the cytruline immunosensor.
Fonte: O autor.

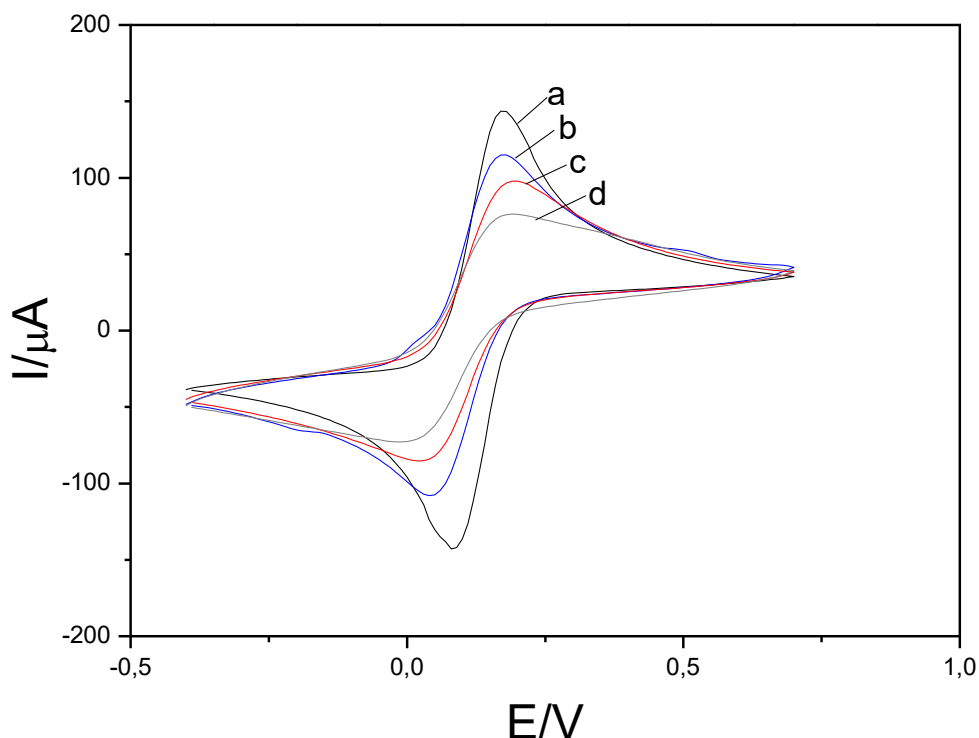


Figure 2: Cyclic voltammograms of the immunosensor in each immobilization step: (a) bare Au-SPE; (b) TGA/Au-SPE; (c) CCP/TGA/Au-SPE; and (d) glycine/CCP/TGA/Au-SPE. Scans performed in $5\text{mmol L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, at 0.1 Vs scanning rate.

3.2 Study of incubation time.

The incubation time is the reaction time of the antigen (CCP peptide) with the antibodies (anti-CCP). The effect of the incubation time on response signals was investigated. When the antigens in the incubating solution reach the antibodies at the surface of the immunosensor, it takes time for the contacting species to form compact immunocomplexes (Arduini, Guidone, Amine, Palleschi, & Moscone, 2013). The amperometric signal rapidly increases with the incubation time up to 30 min, and then the change slows down, which seems to be a consequence of mass action effects as the concentration of free CCP decreases (Fig. 3). The response signal tends to be stable after incubating for 40 min and this was used as the optimal incubation time for most experiments. One would expect that most of the surface-exposed antigens are binding with the antibodies in the

incubation solution, forming compact complexes on the surface of the immunosensor.

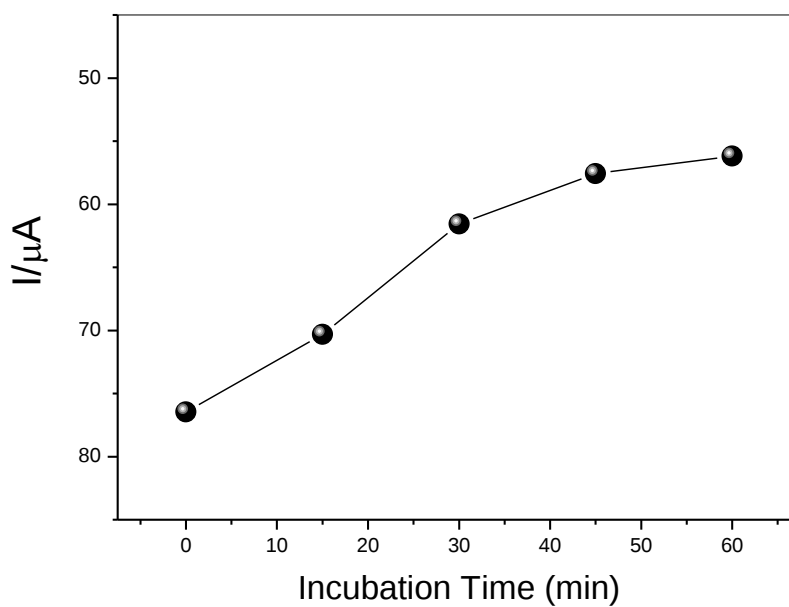


Figure 3: Study of incubation time — equimolar $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM) in 0.1 M KCl solution was used for electrochemical measurements. For voltammetric measurements, a potential range from -0.4 to +0.8 V was used with a scanning rate of 50 mV s^{-1} . All steps were performed at room temperature.

3.3 Analytical response to the anti-CCP.

Under optimized experimental conditions, the calibration curve of the immunosensor was obtained. The electrodes were incubated in various concentrations of anti-CCP for 40 min and then were submitted to CV measurements in the presence of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mmol L^{-1}) in KCl (1 mmol L^{-1}). The calibration curve indicated a gradual decrease in CV current peaks with increased anti-CCP concentrations (Fig. 4). This reflected the good linear relationships between the change in current and the concentration of anti-CCP — a correlation coefficient of 0.988 ($p < 0.0001$, $n = 6$) and a low relative error ($\ll 1\%$) were obtained. Based on the RSD of the blank and the slope of the calibration

curve, the LOD was calculated as: $\text{LOD}=3(\text{RSD}/\text{slope})$. SPEs made of gold exhibited a lower LOD (0.303 ng mL^{-1}) than previously described for anti-CCP electrochemical immunosensors (Villa et al., 2011).

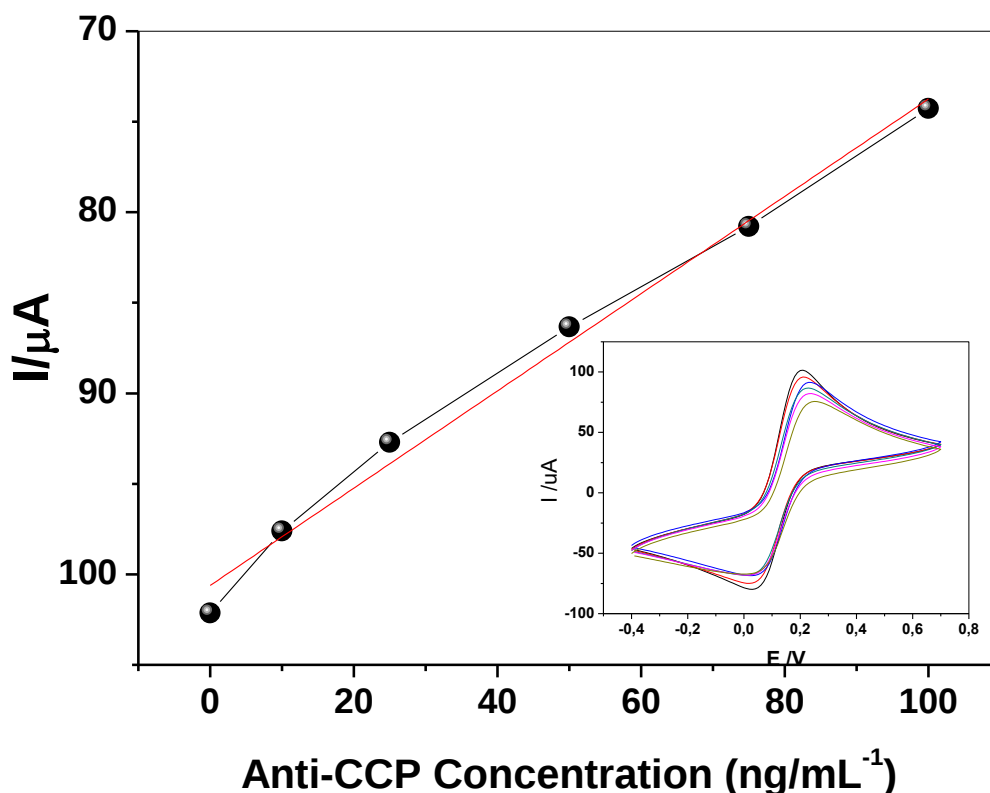


Figure 4: (a) CVs of immunosensor response to different anti-CCP concentrations (10 to 100 ng mL^{-1}) in the presence of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mmol L^{-1}) in KCL (100 mmol); (b) linear fit of the calibration curve.

Conclusion:

In this work we have demonstrated a label-free immunosensor for detecting anti-CCP antibodies, very important for the diagnosis and prognosis of RA. Thioglycolic acid was self-assembled on the gold electrode to obtain a layer of modified film. Such a sensor, in the form of point-of-care in whole blood samples for RA, is specific and simple to use. Other experiments are being conducted in order to continue the study of better therapeutic approaches for rheumatoid patients.

References

- Aggarwal, R., Liao, K., Nair, R., Ringold, S., & Costenbader, K. H. (2009). Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 61(11), 1472–83. doi:10.1002/art.24827
- Arduini, F., Guidone, S., Amine, A., Palleschi, G., & Moscone, D. (2013). Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179, 201–208. doi:10.1016/j.snb.2012.10.016
- Dörner, T., Egerer, K., Feist, E., & Burmester, G. R. (2004). Rheumatoid factor revisited. *Current opinion in rheumatology*, 16(3), 246–53.
- Dos Anjos, L. M. E., Pereira, I. A., d 'Orsi, E., Seaman, A. P., Burlingame, R. W., & Morato, E. F. (2009). A comparative study of IgG second- and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) ELISAs and their combination with IgA third-generation CCP ELISA for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*, 28(2), 153–8. doi:10.1007/s10067-008-0999-5
- Drouvalakis, K. A., Bangsaruntip, S., Hueber, W., Kozar, L. G., Utz, P. J., & Dai, H. (2008). Peptide-coated nanotube-based biosensor for the detection of disease-specific autoantibodies in human serum. *Biosensors & bioelectronics*, 23(10), 1413–21. doi:10.1016/j.bios.2007.11.022
- Lokate, A. M. C., Beusink, J. B., Besselink, G. A. J., Pruijn, G. J. M., & Schasfoort, R. B. M. (2007). Biomolecular interaction monitoring of autoantibodies by scanning surface plasmon resonance microarray imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 129(45), 14013–8. doi:10.1021/ja075103x
- Piermarini, S., Micheli, L., Ammida, N. H. S., Palleschi, G., & Moscone, D. (2007). Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B1 detection. *Biosensors & bioelectronics*, 22(7), 1434–40. doi:10.1016/j.bios.2006.06.029
- Taylor, P., Gartemann, J., Hsieh, J., & Creeden, J. (2011). A Systematic Review of Serum Biomarkers Anti-Cyclic Citrullinated Peptide and Rheumatoid Factor as Tests for Rheumatoid Arthritis, 2011. doi:10.4061/2011/815038
- Van Gaalen, F. a, Visser, H., & Huizinga, T. W. J. (2005). A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(10), 1510–2. doi:10.1136/ard.2004.035089

- Van Venrooij, W. J., van Beers, J. J. B. C., & Pruijn, G. J. M. (2011). Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nature reviews. Rheumatology*, 7(7), 391–8. doi:10.1038/nrrheum.2011.76
- Villa, M. de G., Jiménez-Jorquera, C., Haro, I., Gomara, M. J., Sanmartí, R., Fernández-Sánchez, C., & Mendoza, E. (2011). Carbon nanotube composite peptide-based biosensors as putative diagnostic tools for rheumatoid arthritis. *Biosensors & bioelectronics*, 27(1), 113–8. doi:10.1016/j.bios.2011.06.026
- Xu, X., Zhang, S., Chen, H., & Kong, J. (2009). Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays: recent developments. *Talanta*, 80(1), 8–18. doi:10.1016/j.talanta.2009.06.039
- Zintzaras, E., Papathanasiou, A. a, Ziogas, D. C., & Voulgarelis, M. (2012). The reporting quality of studies investigating the diagnostic accuracy of anti-CCP antibody in rheumatoid arthritis and its impact on diagnostic estimates. *BMC musculoskeletal disorders*, 13(1), 113. doi:10.1186/1471-2474-13-113

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Avanços significativos têm sido alcançados na área da reumatologia a partir do conhecimento da etiopatogenia e fisiopatologia da artrite reumatóide com o intuito de diagnóstico e abordagem terapêutica adequados.
- ✓ As perspectivas para dobramento desta pesquisa será a realização de estudo de caso controle, com um maior contingente de pacientes, incluindo a prevalência do ACCP e a padronização do imunossensor proposto quanto a sua sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para a aplicação em amostras sanguíneas de pacientes reumatóides.
- ✓ Houve uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de IL-6 e as medidas de atividade da doença (ICADs) no total de pacientes independente do tratamento. Pelo critério EULAR a correlação desta citocina ocorreu nos pacientes com maior atividade inflamatória;
- ✓ A frequência de IgG anti-PVB19 foi de 73% nos pacientes com artrite reumatóide;
- ✓ A presença de IgG anti-PVB19 não apresentou correlação com atividade inflamatória, segundo o critério EULAR, apesar do maior número de pacientes IgG positivos estarem no grupo de atividade moderada e alta;
- ✓ No desenvolvimento do imunossensor eletroquímico para anti CCP a curva de calibração mostrou resposta linear, bom coeficiente de correlação e limite de detecção menor do que o método ELISA.

8 OUTROS RESULTADOS

- ✓ A IL-10 não mostrou correlação com nenhuma das medidas de avaliação de atividade inflamatória(ICADs) e proteínas de fase aguda nos pacientes reumatóides no presente estudo;
- ✓ No que respeito aos níveis de IL-10, o papel desta citocina na artrite reumatóide permanece pouco claro, tanto a partir de observações clínicas como teóricas. Estes resultados indicam que pode ser difícil de prever a resposta de uma população de pacientes humanos para a IL-10, apesar de resultados promissores em modelos animais de artrite. O papel de IL-10 na AR se embasa de estudos em ratos, quando anticorpos contra IL-10 agravam a doença, assim como uma completa falta de IL-10. Isto posto são necessários mais estudos do papel desta citocina na fisiopatogenia da AR.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, R.; LIAO, K.; NAIR, R.; RINGOLD, S.; COSTENBADER, K. H. Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 61, n. 11, p. 1472–83, 2009.

ALARCON, R. T.; ANDRADE, L. C. Auto-antibodies to citrullinated proteins and rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 3, p. 180–187, 2007.

ALETAHA, D.; NELL, V. P. K.; STAMM, T.; et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. **Arthritis Res Ther**, v. 7, p. R796–806, 2005.

ALONSO-LOMILLO, M. A.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; FERREIRA-GONÇALVES, L.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A. **Biosensors & bioelectronics**, v. 25, n. 6, p. 1333–7, 2010.

ARDUINI, F.; GUIDONE, S.; AMINE, A.; PALLESCHI, G.; MOSCONE, D. Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 179, p. 201–208, 2013. .

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 2, p. 241–269, 2003.

BIZZARO, N.; MAZZANTI, G.; TONUTTI, E.; VILLALTA, D.; TOZZOLI, R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. **Clinical chemistry**, v. 47, n. 6, p. 1089–93. 2001.

BOISSIER, M. C.; SEMERANO, L.; CHALLAL, S.; SAIDENBERG-KERMANAC'H, N.; FALGARONE, G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. **Journal of autoimmunity**, v. 39, n. 3, p. 222–8. 2012.

BOWES, J.; BARTON, A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. **Rheumatology** (Oxford, England), v. 47, n. 4, p. 399–402. 2008.

BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11. 2008.

BARRA L, HA A, SUN L, FONSECA C, POPE J. Efficacy of biologic agents in improving the Health Assessment Questionnaire (HAQ) score in established and early rheumatoid arthritis: a meta-analysis with indirect comparisons. **Clin Exp Rheumatol**. 2014 Jan 24.

BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 11, p. 3537–45, 2008.

BRUCE, B.; FRIES, J. F. The health assessment questionnaire (HAQ). **Clinical and experimental rheumatology**, v. 23, n. 5, p. S14, 2005.

BURMESTER, G. R.; FEIST, E.; DÖRNER, T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 2, p. 77-88. 2014.

CARMONA, L.; CROSS, M.; WILLIAMS, B.; LASSERE, M.; MARCH, L. Rheumatoid arthritis. Best practice & research. **Clinical rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 733–45, 2010. Elsevier Ltd.

CHAI, R.; YUAN, R.; CHAI, Y.; OU, C.; CAO, S.; LI, X. Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic gonadotrophin. **Talanta**, v.74, p. 1330-1336, 2008.

CHARLES, P.; ELLIOTT, M. J.; DAVIS, D.; et al. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- α therapy in rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 63, n. 3, p. 1521-8, 1999.

CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANA, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 1–2, p. 1–12, 2002.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441–56, 2002.

CHEN, X.; DONG, S. J. **Sol-gel-derived titanium oxide/copolymer composite based glucose biosensor**. **Biosensors and Bioelectronics**, v.18, p.999–1004, 2003.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology** (Oxford, England), v. 51 Suppl 5, p. v3–11. 2012.

CHUNG, J. W.; PARK, J. M.; BERNHARDT R.; PYUN, J.C. Immunosensor with a controlled orientation of antibodies by using NeutrAvidin–protein A complex at immunoaffinity layer. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 325-333, 2006.

CLARK JR, L. C.; LYONS, C.; Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Academy of Sciences**. New York, p. 29, 1962.

COENEN, D.; VERSCHUEREN, P.; WESTHOVENS, R.; BOSSUYT, X. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Clinical chemistry**, v. 53, n. 3, p. 498–504. 2007.

COHEN, B. J.; BUCKLEY, M. M. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. **J Med Microbiol**, v. 25, n. 2, p. 151-153, 1988.

COLMEGNA, I.; ALBERTS-GRILL, N. Parvovirus B19: its role in chronic arthritis. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 95–110. 2009.

CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; REINHOLD, D.; DÖRNER, T. Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 6, p. 431-5. 2010.

CORCORAN, A. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 459–475, 2004.

CORK, J. M.; REBECCA, J.; SAWY, E. Low cost, disposable biosensors allow detection of antibodies with results equivalent to ELISA in 15 min. **Journal of Immunological Methods**, v. 387, n. 1–2, p. 140–146, 2013.

COSSART, Y. E.; CANT, B.; FIELD, A. M.; WIDDOWS, D. Parvovirus-like particles in human sera. **The Lancet**, v. 305, n. 7898, p. 72 - 73, 1975.

CUNHA, B. M.; OLIVEIRA, S. B.; SANTOS-NETO, L. Incidence of infectious complications in hip and knee arthroplasties in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 51, n. 6, p. 609-615, 2011.

CUN-XI, L.; SHUN-QIN, H.; GUO-LI S.; RU-QIN Y. Immobilization of horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode for the detection of hydrogen peroxide. **Talanta** v. 59, n. 5, p. 981–988, 2003.

CUSH, J. J.; SPLAWSKI, J. B.; THOMAS, R.; MCFARLIN, J. E.; SCHULZE-KOOPS, H.; DAVIS, L. S.; FUJITA, K.; LIPSKY, P. E. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 38, n. 1, p. 96-104, 1995.

DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.

DE SOUZA, E. G.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 874-881, 1999.

DIAS, A. C.; GOMES-FILHO, S. L.; SILVA, M.; DUTRA, R. F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 216-221, 2013.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clin Chim Acta**, v. 334, n. 1-2, p. 41-69, 2003.

DÖRNER, T.; EGERER, K.; FEIST, E.; BURMESTER, G. R. Rheumatoid factor revisited. **Current opinion in rheumatology**, v. 16, n. 3, p. 246–53, 2004.

DOS ANJOS, L. M. E.; PEREIRA, I. A.; D'ORSI, E.; SEAMAN, A. P.; BURLINGAME, R. W.; MORATO, E. F. A comparative study of IgG second- and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) ELISAs and their

combination with IgA third-generation CCP ELISA for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Clinical rheumatology**, v. 28, n. 2, p. 153–8, 2009. doi:10.1007/s10067-008-0999-5

DROUVALAKIS, K. A.; BANGSARUNTIP, S.; HUEBER, W.; KOZAR, L. G.; UTZ, P. J.; DAI, H. Peptide-coated nanotube-based biosensor for the detection of disease-specific autoantibodies in human serum. **Biosensors & bioelectronics**, v. 23, n. 10, p. 1413–21, 2008. doi:10.1016/j.bios.2007.11.022

DURAND, P.; SKOTTRUP, M. N. A.; JUSTESEN, F. Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. **Biosens Bioelectron**, v. 24, n. 3, p. 339–48, 2008. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656630800328X>

EGERER, K.; FEIST, E.; BURMESTER, G. R. The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 106, n. 10, p. 159–63, 2009.

EMERY, P.; et al. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 67, n. 11, 1516–1523, 2008.

ESCAMILLA-GÓMEZ, V.; CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical immunosensor designs for the determination of *Staphylococcus aureus* using 3, 3-dithiodipropionic acid di-N-succinimidyl ester)-modified gold electrodes. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 876–881, 2008.

FANJUL-BOLADO, P.; LAMAS-ARDISANA, P. J.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; COSTA-GARCÍA, A. Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes. **Analytica chimica acta**, v. 638, n. 2, p. 133–8, 2009.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Rheumatoid arthritis. **Cell**, v. 85, p. 307–10, 1996.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, p. 137–142, 2006.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356–61, 2003.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A. Emprego de Monocamadas Auto-Organizadas no Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381–389, 2003.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356–61, 2003.

FORSLIND, K.; AHLMÉN, M.; EBERHARDT, K.; HAFSTRÖM, I.; SVENSSON, B. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. 9, p. 1090–5, 2004.

FRANSSILA, R.; HEDMAN, K. Infection and musculoskeletal conditions: Viral causes of arthritis. Best practice & research. **Clinical rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 1139–57, 2006.

FRISELL, T.; HOLMQVIST, M.; KÄLLBERG, H.; et al. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. **Arthritis and rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2773–82, 2013.

GARIFALLIA, S.; CARLO, A. S.; CARLOMAURIZIO, M. Performance of the 2010 Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Review and a Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 73, n. 1, p. 114-23, 2014.

GAALEN, F. A VAN; LINN-RASKER, S. P.; VENROOIJ, W. J. VAN; et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. **Arthritis and rheumatism**, v. 50, n. 3, p. 709–15, 2004.

GAALEN, F. A VAN; VISSER, H.; HUIZINGA, T. W. J. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. 10, p. 1510–2, 2005.

GIBSON, T. D.; HULBERT, J. N.; PARKE S. M. Extended shelf life of enzyme-based biosensors using a novel stabilization system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 10, p. 701-708, 1992.

GLOCKER, E. O.; KOTLARZ, D.; KLEIN, C.; SHAH, N.; GRIMBACHER, B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1246, p. 102-7, 2011.

GOLDRING, S. R.; PURDUE, P. E.; CROTTI, T. N.; et al. Bone remodelling in inflammatory arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, p. ii52- i55, 2013.

GOLICKI, D.; NEWADA, M.; LIS, J.; POL, K.; HERMANOWSKI, T.; TŁUSTOCHOWICZ, M. Leflunomide in monotherapy of rheumatoid arthritis: eta-analysis of randomized trials. **Pol Arch Med Wewn**, v. 122, n. 1-2, p. 22-32, 2012. Epub 2012 Jan 11.

GOODSON, N. J.; FARRAGHER, T. M.; SYMMONS, D. P. Rheumatoid factor, smoking, and disease severity: associations with mortality in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 35, n. 6, p. 945-9, 2008.

GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Rheumatoid arthritis. Epidemiology, pathology, pathogenesis. In: Klippel Jh, Crofford L, Stone JH, et al. eds. *Primer on the Rheumatic Diseases*. 12. ed. Atlanta: **Arthritis Foundation**, p. 209-217, 2001. 16/12/2013.

HE, J.; CHEN, J.; ZHI, Q.; W, YAN. A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 2, p. 337–343, 2007.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621, 1990.

HELAL, A. M. H.; et al. Fatigue in rheumatoid arthritis and its relation to interleukin-6 serum level. **The Egyptian Rheumatologist**, v. 34, n. 4, p. 153-157, 2012.

HENNINGSSON, L.; ENELJUNG, T.; JIRHOLT, P.; et al. Disease-dependent local IL-10 production ameliorates collagen induced arthritis in mice. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49731, 2012.

HUANG-XIAN, J.; YONG-KANG, Y.; JIAN-HUA, Z.; YONG-LIN, Z. Hybridization biosensor using di(2,20-bipyridine)osmium (III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain reaction product of hepatitis B virus DNA. **Analytical Biochemistry**, v. 313, p. 255–261, 2003.

INGEGNOLI, F.; CASTELLI, R.; GUALTIEROTTI, R. Rheumatoid factors: clinical applications. **Dis Markers**, v. 35, n. 6, p. 727-34, 2013. Acesso em: 29/1/2014.

MOHAMMED, A. S. E. F.; GUPTA, S. G.; HUSSAINI, S. S. A Review on Electrochemical Biosensors: Principles and Applications. **Advances in Bioresearch**, v. 3, p. 4, 2012.

JIN, Y.; YAO, X.; LIU, Q.; LI, J. Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator. **Biosensors & bioelectronics**, v. 22, n. 6, p. 1126–30, 2007.

JUSTINO, C. I. L.; ROCHA-SANTOS, T. A.; DUARTE, A. C. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1172–1183, 2010.

KLARESKOG, L.; MALMSTRÖM, V.; LUNDBERG, K.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Seminars in Immunology**, v. 23, p. 92–98, 2011.

KALLBERG, H.; PADYUKOV, L.; PLENKE, R. M.; et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. **American journal of human genetics**, v. 80, n. 5, p. 867–75, 2007.

KÄLLBERG, H.; DING, B.; PADYUKOV, L.; BENGTSSON, C.; RÖNNELID, J.; KLARESKOG, L.; ALFREDSSON, L. EIRA Study Group. Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. **Ann Rheum Dis**, v. 70, p. 508–511, 2011.

KERR, J. R.; CARTRON, J. P.; CURRAN, M. D.; MOORE, J. E.; ELLIOTT, J. R.; MOLLAN, R. A. A study of the role of parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**, v. 34, n. 9, p. 809-813, 1995.

KEYSTONE, E. C.; HARAOU, B. Therapeutic targets for rheumatoid arthritis. **J Rheumatol Suppl**, v. 82, n. 1, 2009.

KIRWAN, J. Measures of Rheumatoid Arthritis Disease Activity. **The Journal of rheumatology**, v. 36, n. 2, p. 442-442, 2009.

KLARESKOG, L.; MALMSTRÖM, V.; LUNDBERG, K.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Seminars in immunology**, v. 23, n. 2, p. 92–8, 2011a.

KLIMIUK, P. A.; YANG, H.; GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Production of Cytokines and Metalloproteinases in Rheumatoid Synovitis Is T Cell Dependent. **Clinical Immunology**, v. 90, n. 1, p. 65–78, 2013.

KOKKONEN, H.; SODERSTROM, I.; ROCKLOV, J.; HALLMANS, G.; LEJON, K.; DAHLQVIST, S. R. Up-Regulation of Cytokines and Chemokines Predates the Onset of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 2, p. 383–391, 2010.

KOKKONEN, H.; SÖDERSTRÖM, I.; ROCKLÖV, J.; et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 62, n. 2, p. 383–91, 2010.

KUMAR, A. Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and application. **JOM – Minerals, Metals & Materials Society**, v. 52, n.10, p. 15-20, 2000.

LEDRU, S.; RUIILLÉ, N.; BOUJTITA, M. One-step screen-printed electrode modified in its bulk with HRP based on direct electron transfer for hydrogen peroxide detection in flow injection mode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 8, p. 1591–8, 2006..

LEE, J.; KIM, M.; HONG, C. K.; SHIM, S. E. Measurement of the dispersion stability of pristine and surface-modified multiwalled carbon nanotubes in various nonpolar and polar solvents. **Measurement Science and Technology**, v. 18, p.3707–3712, 2007.

LINDEN, M. P. M. VAN DER; WOUDE, D. VAN DER; IOAN-FACSINAY, A.; et al. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rh. **Arthritis and rheumatism**, v. 60, n. 8, p. 2232–41, 2009.

LOKATE, A. M. C.; BEUSINK, J. B.; BESSELINK, G. A. J.; PRUIJN, G. J. M.; SCHASFOORT, R. B. M. Biomolecular interaction monitoring of autoantibodies by scanning surface plasmon resonance microarray imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 45, p. 14013–8, 2007.

LORETO, C.; MARITA, C.; WILLIAMS, B.; LASSERE, M.; MARCH, L. Rheumatoid arthritis. **Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 24, p.733–745, 2010.

LOWINSOHN, D.; QUÍMICA, I. DE; SÃO, U. DE; SP, S. P. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318–1325, 2006.

LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 314, n. 1-2, p. 1–26, 2001.

MARQUETTE, C. A.; BLUM, L. J. Chemiluminescent enzyme immunoassays: a review of bioanalytical applications. **Bioanalysis**, v. 1, n. 7, p. 1259-1269, 2009.

MASI, A. T.; et al. Serum Acute Phase Protein and Inflammatory Cytokine Network Correlations: Comparison of a Pre-Rheumatoid Arthritis (pre-RA) and Non-RA Community Cohort. 2012.

MASSARDO, L.; GARECA, N.; CARTES, M. A; et al. The presence of the HLA-DRB1 shared epitope correlates with erosive disease in Chilean patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 41, n. 2, p. 153–6, 2002.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–19, 2011.

MEDYANTSEVA, E. P.; KHALDEEVA, E. V.; BUDNIKOV, G. K. Immunosensors in Biology and Medicine: Analytical Capabilities, Problems, and Prospects. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 886-900, 2001.

MEYER, O. Parvovirus B19 and autoimmune diseases. **Joint Bone Spine**, v. 1, p. 6–11, 2003

MITTAL, G. A.; JOSHI, V. R. IL-10 in early rheumatoid arthritis. **J Indian Rheumatol Assoc**, v. 10, p. 59-60, 2002.

MILMAN, N.; KARSHA, J.; BOOTHA, R. A. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 1309–1314, 2010.

MOTA, L. M. H. DA; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 152–174, 2012.

MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 177–84, 2006

NIRSCHL, M.; REUTER, F.; VÖRÖS, J. Review of Transducer Principles for Label-Free Biomolecular Interaction Analysis. **Biosensors**, v. 1, n. 3, p. 70-92, 2011.

PARAMALINGAM, S. S.; et al. In vivo Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Normal and Patients with Rheumatoid Arthritis. **Annals-Academy Of Medicine Singapore**, v. 36, p. 96-99, 2007.

PERRICONE, C.; CECCARELLI, F.; VALESINI, G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. **Autoimmunity reviews**, v. 10, n. 10, p. 599–608, 2011.

PIERMARINI, S.; MICHELI, L.; AMMIDA, N. H. S.; PALLESCHI, G.; MOSCONE, D. Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B1 detection. **Biosensors & bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1434–40, 2007.

PINCUS, T.; SOKKA, T. Quantitative measures and indices to assess rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 30, n. 4, p. 725-51, 2004.

PING J, WU J, Wang Y, Ying Y. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using high-performance screen-printed graphene electrode.

POHANKA, M.; SKLÁDAL, P. Electrochemical biosensors – principles and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 6, n. 2, p. 57-64, 2008.

RADNER, H.; NEOGI, T.; SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D. Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: a systematic literature review. **Ann Rheum Dis**, v. 73, p. 114-123, 2014.

RADOMINSKI, S.; OLIVEIRA, S. M. Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. **Rev Bras Reumatol**, v. 33, p. 169–73, 1993.

RENEDO, O. D.; ALONSO-LOMILLO, M. A; MARTÍNEZ, M. J. A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 202–19, 2007.

RICCARDI, C. DOS S.; COSTA, P. I. DA; YAMANAKA, H. IMUNOSSENSOR AMPEROMÉTRICO Quim. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society**, v. 39, n. 5, 1747-1763, 2010.

SANTOS R. L. DE SOUZA. Influência do parvovírus humano B19 Infecção na Artrite Reumatóide. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical - Centro de Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2008.

SCHELLEKENS, G. A; JONG, B. A DE; HOOGEN, F. H. VAN DEN; PUTTE, L. B. VAN DE; VENROOIJ, W. J. VAN. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 1, p. 273–81, 1998.

SCHELLEKENS, G. A; VISSER, H.; JONG, B. A DE; et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. **Arthritis and rheumatism**, v. 43, n. 1, p. 155–63, 2000a.

SCHETT, G.; TEITELBAUM, S. L. Perspective Osteoclasts and Arthritis. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 24, n. 7, 2009.

SCHETT, G.; GRAVALLESE, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 11, p. 656–64, 2012. Nature Publishing Group.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.

SENNA, É. R.; BARROS, A. N. A. L. P. D. E.; SILVA, E. O.; et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil : A Study Using the COPCORD Approach. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–597, 2004.

SHEN, G.; TAN, S.; NIE, H.; SHEN, G.; YU, R. Electrochemical and piezoelectric quartz crystal detection of antisperm antibody based on protected Au nanoparticles with a mixed monolayer for eliminating nonspecific binding. **Journal of immunological methods**, v. 313, n. 1-2, p. 11–9, 2006.

SHEN, WEN, et al. "Nanoparticle-based electrochemiluminescence immunosensor with enhanced sensitivity for cardiac troponin I using N-(aminobutyl)-N-(ethylisoluminol)-functionalized gold nanoparticles as labels." *Biosensors and Bioelectronics*, v. 27, n. 1, p. 18-24. 2011.

SHMERLING, R. H.; DELBANCO, T. L. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 5, p. 528–34, 1991.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis research**, v. 4, n. 3, p. S265–72, 2002.

SILVA, B. V.; CAVALCANTI, I. T.; SILVA, M.; DUTRA, R. F. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**, n. 117, p. 431–437, 2013.

SINGH, J. A.; BEG, S.; LOPEZ-OLIVO, M. A. Tocilizumab for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. **J Rheumatol**, v. 38, n. 1, p. 10–20, 2011.

SINGH, J. A.; FURST, D. E.; BHARAT, A.; et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis care & research**, v. 64, n. 5, p. 625–39, 2012a.

SIVALINGAM, S. P.; THUMBOO, J.; VASOO, S.; et al. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 36, n. 2, p. 96–9, 2007.

SMOLEN, J. S.; BREEDVELD, F. C.; SCHIFF, M. H.; KALDEN, J. R.; EMERY, P.; EBERL, G.; et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. **Rheumatology**, v. 42, p. 244–57, 2003.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; BIJLSMA, J. W. J.; et al. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 4, p. 631–7, 2010.

SUN Z, L DENG, GAN H, SHEN R, YANG M, ZHANG Y. Sensitive immunosensor for tumor necrosis factor α based on dual signal amplification of ferrocene modified self-assembled peptide nanowire and glucose oxidase functionalized gold nanorod. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 215–219, 2013.

ROBAK T, GLADALSKA A, STEPIEŃ H, ROBAK E. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. **Mediators Inflamm**, v. 7, n. 5, p. 347–53, 1998.

STADT, L. A VAN DE; KONING, M. H. M. T. DE; STADT, R. J. VAN DE; et al. Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 63, n. 11, p. 3226–33, 2011.

STOREY, G. O.; COMER, M.; SCOTT, D. L. Chronic arthritis before 1876: early British cases suggesting rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 53, n. 9, p. 557–60, 1994.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical Sensors : A Powerful Tool in Analytical Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 159–173, 2003.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical Sensors : A Powerful Tool in Analytical Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 159–173, 2003.

TAK, P. P.; BRESNIHAN, B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 12, p. 2619–2633, 2000.

TANG, J.-L.; CHENG, S.-F.; HSU, W.-T.; CHIANG, T.-Y.; CHAU, L.-K. Fiber-optic biochemical sensing with a colloidal gold-modified long period fiber grating. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 119, n. 1, p. 105–109, 2006.

TAKAHASHI, Y.; MURAI, C.; SHIBATA, S.; MUNAKATA, Y.; ISHII, T.; ISHII, K.; SAITOH, T.; SAWAI, T.; SUGAMURA, K.; SASAKI, T. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 95, n. 14, p. 8227-8232, 1998.

TAYLOR, P.; GARTEMANN, J.; HSIEH, J.; CREEDEN, J. A Systematic Review of Serum Biomarkers Anti-Cyclic Citrullinated Peptide and Rheumatoid Factor as Tests for Rheumatoid Arthritis. **Autoimmune Disease**, 2011.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1530–1543, 2008.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosens Bioelectron**, v. 16, n. 1-2, p. 121-31, 2001

TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, n. 35, p. 10-14, 2010.

USNAYO, M. J. G.; ANDRADE, L. E. C.; ALARCON, R. T.; et al. Study of the frequency of HLA-DRB1 alleles in Brazilian patients with rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 5, p. 474–483, 2011.

USÓN, J.; Balsa, A.; PASCUAL-SALCEDO, D.; et al. Soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 levels in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies. **J Rheumatol**, v. 24, n. 11, p. 2069-75, 1997.

VAN GAALEN, F. A.; VISSER, H.; HUIZINGA, T. W. J. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 64, n. 10, p. 1510–2, 2005.

VAN VENROOIJ, W. J.; VAN BEERS, J. J. B. C.; PRUIJN, G. J. M. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nature reviews*. **Rheumatology**, v. 7, n. 7, p. 391–8, 2011.

VENCOVSKÝ, J.; MACHÁČEK, S.; SEDOVÁ, L.; et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 62, n. 5, p. 427–30, 2003.

VENROOIJ, W. J. VAN; HAZES, J. M.; VISSER, H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. **The Netherlands journal of medicine**, v. 60, n. 10, p. 383–8, 2002a.

VENROOIJ, W. J. VAN; HAZES, J. M.; VISSER, H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. **The Netherlands journal of medicine**, v. 60, n. 10, p. 383–8, 2002b.

VIEIRA, N. C. S. Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes Finos de In_2O_3 :S. 2006, 141f. Dissertação de mestrado em Ciências dos Materiais, Universidade Federal de Itajubá; 2006.

VILLA, M. DE G.; JIMÉNEZ-JORQUERA, C.; HARO, I.; GOMARA, M. J.; SANMARTÍ, R.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; MENDOZA, E. Carbon nanotube composite peptide-based biosensors as putative diagnostic tools for rheumatoid arthritis. **Biosensors & bioelectronics**, v. 27, n. 1, p. 113–8, 2011.

VOSSENAAR, E. R.; VENROOIJ, W. J. VAN. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 6, n. 3, p. 107–11, 2004.

WANG, J.; TIAN, B.; NASCIMENTO, V. B. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. **Electrochimica Acta**, v. 43, n. 23, p. 3459–3465, 1998.

WEYAND, C. M.; XIE, C.; GORONZY, J. J. Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 89, n. 6, p. 2033–9, 1992.

WU, L.; YAN, F.; JU, H. An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber. **Journal of Immunological Methods**, v. 322, p.12–19, 2007.

YE, Y. K.; ZHAO, J. H.; YAN, F.; ZHU, Y. L.; JU, H. X. Electrochemical behavior and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 1501-1508, 2003.

YOO, E. H.; LEE S. Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4558-4576, 2010.

YOUNG, B. J.; MALLYA, R. K.; LESLIE, R. D.; CLARK, C. J.; HAMBLIN, T. J. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. **British medical journal**, v. 2, n. 6182, p. 97–9, 1979. .

YOUINOU, P.; JAMIN, C.; SARAUX, A. B-cell: a logical target for treatment of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 25, n. 2, p. 318-28, 2007. Review

YUAN-DI Z.; DAI-WEN P.; SHEN H.; ZONG-LI W.; JIE-KE C.; HONG-PING D. DNA-modified electrodes; part 4: optimization of covalent immobilization of DNA on self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 49, p. 751–756, 1999.

XU, X.; ZHANG, S.; CHEN, H.; KONG, J. Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays: recent developments. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 8–18, 2009.

ZHANG, W.; et al. Parvovirus B19V DNA contamination in Chinese plasma and plasma derivatives. **Journal of translational medicine**, v. 10, n. 1, p.194, 2012.

ZIDI, I.; BOUAZIZ, A.; BEN, A. N. Golimumab and immunogenicity? 2010 and beyond. **Pharmazie**, v. 66, n. 4, p. 233-43, 2011.

ZINTZARAS, E.; PAPATHANASIOU, A. A; ZIOGAS, D. C.; VOULGARELIS, M. The reporting quality of studies investigating the diagnostic accuracy of anti-CCP antibody in rheumatoid arthritis and its impact on diagnostic estimates. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 13, n. 1, p. 113, 2012. doi:10.1186/1471-2474-13-113.

ZHANG, S.; G. WRIGHT.; Y. YANG. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 5, p. 273-282, 2000.

ZHANG, J. I. N. G. Carbon nanohorn sensitized electrochemical immunosensor for rapid detection of microcystin-LR. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 3, p.1117-1122, 2010.

ZHU, L.; YANG, R.; ZHAI, J.; TIAN, C. Enzymatic glucose biosensor based on co-immobilization of peroxidase and glucose oxidase on a carbon nanotubes electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 4, p. 528-535, 2007.

APÊNDICE

Universidade de Pernambuco Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

Ambulatório de Reumatologia/Centro de Infusão Imunobiológico.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa AVALIAÇÃO DE CITOCINAS (IL-6 e IL-10), DA FREQUÊNCIA DA IgG DO PARVOVÍRUS B19 E DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA ANTI- PEPTÍDEO CITRULINADO CÍCLICO (ACCP) sob a responsabilidade do pesquisador Maria Helena Queiroz de Araújo Mariano, Sua participação é voluntária e se dará por meio de coleta de amostra de sangue. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa se relacionam às coletas de amostras sanguíneas. Se você aceitar participar, estará contribuindo para melhor avaliação da atividade da e detecção deste Anticorpo cuja presença se relaciona com uma forma mais grave de Artrite Reumatóide e uma vez tendo acesso a esta informação é possível um tratamento mais adequado.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço (Hospital U. Oswaldo Cruz situado a rua Arnóbio Marques, 310. Santo Amaro), pelo telefone (81) (3184 - 1325) ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UPE, situado à rua Arnóbio Marques, 310. Santo Amaro.

Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer, porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar da pesquisa, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____/____/____

Assinatura do participante

Impressão do dedo polegar

Caso não saiba assinar

Assinatura do pesquisador

ANEXOS

HAQ-II O HAQ de duas páginas, ou HAQ-II, é o mais usado e mais comumente referido como HAQ. É uma versão em 10 itens do HAQ-padrão. Mais simples e rápido de executar, relacionar-se com as medidas clínicas do que o modelo maior e é compatível com o uso na clínica e em pesquisa.. Estamos interessados em saber como sua doença afeta sua habilidade de funcionar na vida diária. Coloque um "X" no quadro que melhor descreve suas habilidades NA ÚLTIMA SEMANA.

Você é capaz de:	Sem qualquer dificuldade (0)	Com alguma dificuldade (1)	Com muita dificuldade (2)	Incapaz de fazer (3)
Levantar-se de uma cadeira sem braços?	☐	☐	☐	☐
Caminhar em lugares planos?	☐	☐	☐	☐
Sentar-se e levantar-se do vaso sanitário?	☐	☐	☐	☐
Alcançar e carregar um objeto de 2,5 kg posicionado pouco acima da sua cabeça?	☐	☐	☐	☐
Abrir portas de automóveis?	☐	☐	☐	☐
Fazer jardinagem?	☐	☐	☐	☐
Permanecer em fila por 15 minutos?	☐	☐	☐	☐
Carregar objetos pesados?	☐	☐	☐	☐
Mover objetos pesados?	☐	☐	☐	☐
Subir dois ou mais degraus?	☐	☐	☐	☐

CRITÉRIO DE RESPOSTA DAS ou DAS28 do EULAR

DAS – DAS28 alcançado		(Melhora em relação ao valor inicial)	
		> 1,2	≤ 1,2 e ≤ 0,6
≤ 2,4	≤ 3,2	Boa resposta	Sem resposta
> 2,4	> 3,2	Resposta moderada	
e ≤ 3,7	e ≤ 5,1		
> 3,7	> 5,1		