



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

MARÍLIA LINS E SILVA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE
CITOCINAS ENVOLVIDAS COM AS RESPOSTAS TH 1, TH 2 E TH 17 EM
INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATOIDE**

Recife/PE

2018

MARÍLIA LINS E SILVA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE
CITOCINAS ENVOLVIDAS COM AS RESPOSTAS TH 1, TH 2 E TH 17 EM
INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATOIDE**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros.

Recife/PE

2018

MARÍLIA LINS E SILVA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE
CITOCINAS ENVOLVIDAS COM AS RESPOSTAS TH 1, TH 2 E TH 17 EM
INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATOIDE**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Odontologia.

Aprovada em: 19/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fábio Lopes de Melo (Examinador Externo)
Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos (Examinador Externo)
Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães

Recife/PE

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Marília Lins e.
Avaliação dos níveis séricos e polimorfismos genéticos de citocinas envolvidas com as respostas TH 1, TH 2 e TH 17 em indivíduos com artrite reumatoide / Marília Lins e Silva. – 2018.
76 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Luiz Alcino Monteiro Gueiros.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Artrite reumatoide. 2. Citocinas. 3. Polimorfismo genético. I. Gueiros, Luiz Alcino Monteiro (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2019-004)

Aos meus pais que sempre me incentivaram a acreditar nos meus sonhos, dedico com carinho este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me presenteou com a aprovação no doutorado e me maravilhou com a convivência com todas as pessoas que cruzaram o meu caminho. Sem Ele jamais estaria concluindo esta pós-graduação e agradecendo a todos que me ajudaram. Ele me deu forças a cada dia nestes últimos anos para que eu não desistisse. Que alegria tê-lo em minha vida.

Aos meus pais, **Fernando Lins e Silva** e **Maria Auxiliadora Régis**, meus maiores e melhores professores, agradeço por apoiarem as minhas decisões e me ensinarem os verdadeiros valores da vida, sendo exemplos de dignidade, honestidade, humildade e perseverança. É uma arte amar vocês, e será sempre o meu melhor texto, a minha melhor sintonia porque vocês são e sempre serão o meu maior amor.

À minha irmã, **Fernanda Lins e Silva**, obrigada pelo incentivo, pela amizade e pelo carinho. Amo você.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, na pessoa do reitor **Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado** e ao programa de pós-graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Alessandra Tavares Carvalho**, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente.

A **CAPES**, pelo auxílio financeiro concedido.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros**, agradeço pela orientação dedicada e pela sabedoria no estímulo às minhas próprias descobertas. Seus ensinamentos tiveram um papel fundamental na realização deste trabalho e na minha trajetória acadêmica. A cada conversa que tínhamos a sensação que ficava era que eu tinha aprendido algo a mais. Ofereço minha gratidão, admiração e respeito.

Aos **professores da pós-graduação** em Odontologia da UFPE pelas experiências e ensinamentos transmitidos, meus sinceros agradecimentos.

À **Dra. Ângela Duarte** pela atenção dispensada e acesso ao serviço de reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. Sua valiosa parceria foi indispensável para que esse trabalho se concretizasse. Obrigada pela confiança em me permitir avaliar seus pacientes.

A **Luydson Richardson** e **Maria Carolina Accioly** por terem me ajudado na etapa laboratorial da pesquisa, me apoiando e acreditando na realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos de forma tão simples e humilde. Para mim, foi um privilégio conviver com vocês.

À amiga **Camila Nunes** que com o passar do tempo se tornou uma irmã, obrigada por permanecer ao meu lado em todos os momentos, por enxugar minhas lágrimas e por me permitir dividir minhas alegrias. Sua valiosa ajuda e dedicação foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Sentirei saudades dos momentos que vivemos juntas, mas me conforto na certeza de que a nossa amizade permanecerá por toda a vida. Obrigada por tudo!

A **Emídio Albuquerque** e **Andreza Pereira**, obrigada pela colaboração nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos **amigos da pós-graduação**, especialmente a **Diego Moura** e **Eduardo Eudes**, pela troca de conhecimentos, companheirismo e amizade.

A **Fábio Melo** e **Walter Lins**, por tornarem a parte laboratorial da pesquisa mais leve e divertida. Obrigada pelas conversas descontraídas dentro e fora do laboratório, e por estarem sempre dispostos a me ajudar. Que todos os pesquisadores tenham o amor e a dedicação pela ciência que vocês têm. Tenho muita admiração por vocês.

Aos **meus alunos do Núcleo de Acolhimento e Pronto Atendimento da UFPE**, por me proporcionarem uma das experiências mais felizes durante a minha pós-graduação. Eu os ensinei sobre acolhimento em serviços de saúde e urgências odontológicas, eles me ensinaram a ser professora.

Ao **Prof. Edvaldo Ferreira**, obrigada por desempenhar tão bem os papéis de professor e amigo, e pelo incentivo para que eu permanecesse na pós-graduação. O senhor é um grande exemplo para minha vida profissional.

À **Karla Ximenes, Karinne Azevedo, Camila Cravo, Mônica Vital, Andréa Francisca, Leila Batista, Milena Vieira, Marcelo Ataíde e Rodrigo Muta**, obrigada por serem os melhores amigos que eu poderia ter. Realizar um sonho é muito bom, mas ter amigos com quem compartilhar é, sem dúvida, a verdadeira conquista.

Aos meus **professores da graduação** da Universidade de Pernambuco (FOP/UPE), lembro com muito carinho de todos vocês. Obrigada por me ensinarem através da palavra e do exemplo que a busca pelo conhecimento deve ser contínua.

A todos os **pacientes** que espontaneamente aceitaram participar da pesquisa, muito obrigada pela disponibilidade, e pela oportunidade de conhecer suas histórias de vida.

Com vocês compartilho esta conquista e toda a minha gratidão!

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar perfis sorológicos de citocinas Th1, Th2 e Th17 e verificar a associação entre polimorfismos genéticos do *IL6* (rs1800795; rs1800796; rs2069849) e a atividade da doença e função de glândulas exócrinas em indivíduos com AR. A amostra do estudo incluiu 295 mulheres. Entre as participantes, 173 apresentaram diagnóstico de AR e 122 eram saudáveis. As pacientes foram examinadas e foram coletados dados clínicos e amostras de sangue. Os níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A foram mensurados por citometria de fluxo, e os genótipos do *IL6* (rs1800795, rs1800796 e rs2069849) discriminados por PCR em tempo real usando ensaio de genotipagem TaqMan SNP. Observou-se que indivíduos com AR apresentaram níveis mais elevados de TNF ($p=0,005$), IL-2 ($p=0,002$), IL-4 ($p=0,002$) e IL-6 ($p<0,0001$) quando comparados ao grupo controle. Níveis aumentados de TNF e IL-2 estiveram relacionados aos sinais/sintomas sicca, e o nível da IL-6 foi maior entre os indivíduos que apresentaram doença ativa ($p=0,019$) e incapacidade funcional moderada/grave ($p=0,014$). Não se observou associação entre os genótipos e os níveis séricos da IL-6. Os genótipos GC/CC do *IL6* (rs1800796) estiveram associados à presença de AR ($p<0,0001$; OR 5,83; IC 3,25-10,47) e a xeroftalmia ($p=0,003$; OR 2,24; IC 1,33-3,77). Não houve associação do *IL6* (rs1800795 e rs2069849) e a presença de AR e as características clínicas estudadas. Diante do exposto, concluiu-se que a AR apresenta um perfil multicitocinas e a IL-6 pode ser considerada uma citocina importante no contexto da atividade da doença. A elevação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias está associada a sintomas extra-articulares da AR. Além disso, a presença do alelo C do *IL6* (rs1800796) parece desempenhar um papel importante na patogênese da AR e, se confirmado em outras populações, poderá ser utilizado como um indicador de risco da doença.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide. Citocinas. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the serological profiles of Th1, Th2 and Th17 cytokines and verify the association between *IL6* genetic polymorphisms (rs1800795; rs1800796; rs2069849) and disease activity and exocrine gland function in RA subjects. The study sample included 295 women. Among the participants, 173 had a diagnosis of RA and 122 were healthy. Patients were examined and clinical data and blood samples were collected. Serum IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A levels were measured by flow cytometry, and *IL6* genotypes (rs1800795, rs1800796 and rs2069849) were performed by real-time PCR using TaqMan SNP genotyping assay. It was observed that individuals with RA presented significantly higher levels of TNF ($p=0.005$), IL-2 ($p=0.002$), IL-4 ($p=0.002$) and IL-6 ($p<0.0001$) when compared with the healthy controls. Increased TNF and IL-2 levels were related to sicca signs / symptoms, and IL-6 levels were higher among subjects who had active disease ($p = 0.019$) and moderate / severe functional disability ($p = 0.014$). There was no association between genotypes and serum IL-6 concentration. The IL6 GC / CC genotypes (rs1800796) were significantly associated with the presence of RA ($p <0.0001$, OR 5.83, CI 3.25-10.47) and xerophthalmia ($p = 0.003$, OR 2.24 ; IC 1.33-3.77). There was no association of *IL6* (rs1800795 and rs2069849) and the presence of RA and the clinical characteristics studied. In view of the above, it was concluded that RA presented a multicytokine profile and IL-6 may be considered an important cytokine in the context of disease activity. Elevated serum levels of pro-inflammatory cytokines are associated with extra-articular RA symptoms. The presence of the C allele of IL6 (rs1800796) plays an important role in the pathogenesis of RA and, if confirmed in other populations, may be used as a risk indicator of the disease.

Keywords: Rheumatoid arthritis. Cytokines. Genetic polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Artrite reumatoide
DAS28	<i>Disease activity score</i> (28 articulações)
EVA	Escala visual analógica
FSR	Fluxo salivar em repouso
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HCV	Vírus da hepatite C
HAQ	<i>Health assessment questionnaire</i>
IFN	Interferon
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
ml	Mililitro
SS	Síndrome de Sjögren
Th	Células T auxiliárias
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
pg	Picograma
OR	<i>Odds ratio</i>

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 01

Tabela 01 –	Características clínicas dos indivíduos com artrite reumatoide e grupo controle	37
Tabela 02 –	Associação entre os níveis séricos de citocinas e os sinais/sintomas sicca e atividade da doença em indivíduos com artrite reumatoide	40

ARTIGO 02

Tabela 01 –	Características clínicas dos participantes dos indivíduos com artrite reumatoide e grupo controle	61
Tabela 02 –	Associação entre os níveis séricos de IL-6 e as características clínicas de indivíduos com artrite reumatoide	62
Tabela 03 –	Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos do <i>IL6</i>	63
Tabela 04 –	Associação entre os genótipos do <i>IL6</i> (rs1800796) e as características clínicas estudadas	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	17
3	METODOLOGIA.....	18
4	RESULTADOS.....	21
4.1	Artigo 01 – Citocinas na artrite reumatoide: Associação com a atividade da doença e função das glândulas exócrinas.....	21
4.2	Artigo 02 – Avaliação de polimorfismos do IL6 e sua associação com a artrite reumatoide em mulheres brasileiras.....	42
5	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	APÊNDICE A – PRONTUÁRIO CLÍNICO.....	67
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	71
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	73

1 INTRODUÇÃO

O termo “artrite reumatoide” (AR) foi introduzido em 1858 pelo médico londrino Sir Alfred Garrod, substituindo os termos utilizados até então utilizados: artrite deformadora ou gota reumática, e, a partir desta data, a AR passou a ser registrada nos livros de medicina e prontuários. Entretanto, achados arqueológicos, literários e artísticos indicam que os primeiros casos de AR datam de 4500 a.C. (Short, 1974).

Evidências apontam que a AR era uma doença predominante entre Egípcios, e pesquisadores que apoiam essa teoria baseiam-se em um antigo tratado de medicina, o papiro Ebers, no qual é descrito uma patologia com sintomas muito semelhantes à AR, sendo provavelmente a primeira referência a esta doença (Martins, 1989). Um texto indiano de aproximadamente 300 – 200 a.C, denominado Charak Samhita, descreveu uma patologia que envolvia articulações dolorosas em ambas as mãos e pés, que podia se espalhar para outras áreas do corpo, com inchaço, perda de mobilidade, e também febre ocasional e perda de apetite. Igualmente, Hipócrates descreveu a artrite em 400 a.C. sem relatar tipos específicos desta doença, mas com semelhança às descrições acima (Short, 1974; Martins, 1989).

A AR é uma doença autoimune, inflamatória, sistêmica e crônica marcada por inflamações nas membranas sinoviais e estruturas articulares (Smolen *et al.*, 2016). Acomete aproximadamente 0,5% a 1,0% da população mundial, e apresenta um predomínio pelo sexo feminino, atingindo cerca de três mulheres para cada homem, com maior incidência entre a quarta e a sexta décadas de vida (Roberts *et al.*, 2015).

A AR é a forma mais comum de poliartrite crônica e é caracterizada por envolvimento simétrico e bilateral das articulações periféricas principalmente das mãos e dos pés. O comprometimento das articulações é devido à intensa inflamação da membrana sinovial, resultando na invasão da cartilagem e, conseqüentemente, erosão óssea (Choy *et al.*, 2013). Estes danos ocorrem no início da instalação da doença, por volta do segundo ano, causando sérias deformidades e incapacidades funcionais importantes, o que faz com que a AR se torne economicamente relevante, uma vez que estas incapacidades interferem nas atividades laborais dos pacientes (Cooper, 2000).

Além do envolvimento articular, manifestações extra-articulares como vasculite, neuropatia, pericardite, ceratoconjuntivite seca, esclerite, episclerite, ceratite ulcerativa periférica, nefrite, doença pulmonar reumatoide, amiloidose e nódulos reumatoides podem ser encontrados nos pacientes (Turesson e Jacobsson, 2004). Xerostomia e hipossalivação são

prevalentes em doenças reumáticas e podem limitar significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Pace-Balzan *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2006; Braam *et al.*, 2007). Estudos têm sugerido que os sintomas de secura estão associados com alta atividade da AR (Young e Koduri, 2007; Lins *et al.*, 2016), e tem demonstrado uma associação entre a hipossalivação e o aumento na atividade da AR (Uhlrig *et al.*, 1999). Embora na AR a xerostomia e a hipossalivação tenham sido consideradas manifestações extra articulares da doença, pesquisas têm demonstrado que essas condições geralmente apontam para o diagnóstico de Síndrome de Sjögren (Ishijima *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015).

A complexa fisiopatogênese da AR envolve, entre outros aspectos, a interrelação entre células do sistema imune inato e adaptativo através da produção de citocinas de forma autócrina (ação sobre as células que as produziram) ou parácrina (ação sobre células próximas). As citocinas são pequenas proteínas com papel fundamental na sinalização celular, e que estimulam a proliferação, apoptose, diferenciação e ativação celulares com ações que podem ser sinérgicas e/ou redundantes. São, classicamente, divididas em pró e anti-inflamatórias ou supressoras (Burska *et al.*, 2014). O envolvimento dessas moléculas na susceptibilidade e progressão da doença pode ser ressaltado pelo sucesso do tratamento com anticorpos anti-TNF e pelos níveis alterados de diversas citocinas no líquido sinovial e soro em pacientes com AR (Metawi *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2015).

Uma das vias mais estudadas de gatilho para o desenvolvimento clínico da AR é a de ativação de linfócitos T nos tecidos sinoviais. Esses linfócitos, ao serem ativados por moléculas antigênicas do complexo HLADR, apresentados por macrófagos, linfócitos B ou sinoviócitos, se diferenciam em linfócitos auto reativos Th1 e Th17. A partir desta diferenciação, secretam TNF, IL-1, IL-6, IL-17 e RANKL que estimulam a perpetuação do processo inflamatório através de ativação, migração e adesão leucocitária, ativação endotelial e angiogênese, ativação de condrócitos, expressão de outras citocinas, ativação de osteoclastos, e supressão da atividade das células T regulatórias (McInnes e Schett, 2007; Van Amelsfort *et al.*, 2007; Pickens *et al.*, 2010; McInnes *et al.*, 2016). Também estão envolvidas na perpetuação do processo inflamatório da AR citocinas como interfeiron gama (IFN γ) e interleucina-2 (IL-2). Outras citocinas tentam controlar a destruição óssea, promovendo efeito osteoblastogênico, como a interleucina-4 (IL-4) e exercendo papel supressor sobre os linfócitos ativados, como a interleucina-10 (IL-10) (McInnes e Schett, 2007; McInnes *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da AR decorre de uma sequência de eventos patológicos que evoluem a partir da perda da tolerância imunológica de células T e B contra auto antígenos, decorrente da influência de fatores genéticos e ambientais (Scott *et al.*, 2011; Svendsen *et al.*, 2013; Tsai e Santamaria, 2013). A resposta é deflagrada contra auto antígenos citrulinados, gerados mediante síntese proteica e que posteriormente associam-se a moléculas de MHC para apresentação a células T (Yoshida e Tanaka, 2014). Os linfócitos T ativados estimulam células B com concomitante produção de auto anticorpos anti-citrulina e mediadores inflamatórios no tecido articular com a participação de diversas células e mediadores como TNF, IL-1, IL-6, IL-7, IL-15, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-21, IL-23, IL-32 e IL-33 (Pablos e Canete, 2013; Yoshida e Tanaka, 2014). Assim, durante o curso da AR as células T e outras células do sistema imunológico são recrutadas para o tecido sinovial, onde se produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e interagem com fibroblastos sinoviais e macrófagos, os quais contribuem para o desenvolvimento da patogênese. Estas incluem as células CD4+ e CD8+, a maioria com um fenótipo ativado. A AR foi classicamente considerada uma doença mediada por Th1, mas evidências atuais indicam envolvimento de Th2, Th17 e células Treg. No entanto, ainda não está claro se estas são subpopulações realmente separadas ou se elas representam plasticidade e heterogeneidade dentro da linhagem Th17. Cada um desses subconjuntos de células atua em fases distintas do curso da doença, para participar na rede complexa de interações célula-célula que governa o início e a progressão da AR, incluindo a liberação de mediadores inflamatórios, indução de proliferação celular, e angiogênese (McInnes e Schett, 2007). A importância do sistema imunológico na patogênese da doença é ilustrada pelo sucesso de terapias biológicas que visam citocinas inflamatórias chave, moléculas imunes e células imunes (McInnes e Schett, 2007; 2011).

Diversas citocinas estão envolvidas na patogênese da AR. Particularmente, a IL-6 induz a produção de reagentes de fase aguda no fígado, está envolvida na ativação de células imunes inatas e adaptativas e contribui para o processo inflamatório crônico da AR (Wang *et al.*, 2013). A IL-6 também inibe a geração de células Treg e, em conjunto com o TGF- β , promove células T naíves para se diferenciar preferencialmente em células Th17 (Kimura e Kishimoto, 2010). Níveis elevados de IL-6 foram relatados em várias doenças inflamatórias e auto-imunes crônicas, bem como no câncer (Hunter e Jones, 2015).

Fatores ambientais também são sugeridos como fatores de risco para o desenvolvimento da AR, dentre eles se destacam o tabagismo, exposição a solventes orgânicos, a poeira orgânica, óleos minerais, fertilizantes e aerossóis poluentes (Olsson *et al.*,

2004; Hoovestol e Mikuls, 2011). De fato, trabalhos na literatura mostram que a exposição de indivíduos aos poluentes presentes na fumaça do cigarro acelera processos de citrulinização das proteínas (Makrygiannakis *et al.*, 2006). Além disso, estudos epidemiológicos descrevem que o risco de desenvolvimento de AR em indivíduos fumantes é maior do que em pessoas que não fumam (Stolt *et al.*, 2003; Aho e Heliövaara, 2004). Adicionalmente, algumas infecções virais, como por exemplo, Epstein-Barr vírus, e bacterianas também são descritas como fatores de risco para o surgimento da doença (Toussiot e Roudier, 2007; Dissick *et al.*, 2010)

Os mecanismos de patogênese e padrão de resposta inflamatória predominantes na AR necessitam ser melhor compreendidos, fornecendo assim, subsídios para o desenvolvimento de futuras estratégias no manejo destes pacientes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar perfis sorológicos de citocinas Th1, Th2 e Th17 e verificar a associação entre polimorfismos genéticos do *IL6* e a atividade da doença e função de glândulas exócrinas em indivíduos com AR.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Identificar os níveis séricos de citocinas Th1, Th2 e Th17 e verificar a associação entre polimorfismos genéticos do *IL6* e a atividade da doença e função de glândulas exócrinas em indivíduos com artrite reumatoide.

Objetivos Específicos

- Determinar os níveis séricos de citocinas envolvidas com o perfil Th1, Th2, e Th17 de linfócitos T em indivíduos com artrite reumatoide;
- Analisar a associação entre os níveis séricos de citocinas e a atividade da doença e função de glândulas exócrinas em indivíduos com artrite reumatoide;
- Comparar a frequência das variantes alélicas e genótípicas dos polimorfismos genéticos do *IL6* entre indivíduos com artrite reumatoide e controles saudáveis;
- Verificar a associação dos níveis séricos da IL-6 com seus respectivos polimorfismos;
- Analisar a associação entre os polimorfismos genéticos do *IL6* e a atividade da doença e função das glândulas exócrinas em indivíduos com artrite reumatoide.

3 METODOLOGIA

Desenho do estudo

Foi realizado um estudo transversal, no período de março de 2015 a dezembro de 2016. O presente estudo foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa foi realizado um estudo sorológico para a identificação dos níveis séricos das citocinas Th1, Th2 e Th17 e sua associação com a artrite reumatoide. Em uma segunda etapa foi realizado um estudo genético do *IL6*. Foram comparadas as frequências alélicas e genótípicas de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em indivíduos portadores de artrite reumatoide.

População alvo e definição do tamanho da amostra

Todos os pacientes foram provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE). O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis pareados para sexo e idade (± 5 anos) com os pacientes, e provenientes do Serviço de Estomatologia da UFPE, e a amostra foi obtida por conveniência.

Grupos de estudo e critérios de inclusão e exclusão

a) Grupo AR

Critérios de inclusão: Pacientes do sexo feminino com idade acima de 18 anos, portadores de artrite reumatoide de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia.

Critérios de exclusão: Foram excluídos da pesquisa os pacientes portadores de artrite reumatoide juvenil e pacientes com diagnóstico de outras artrites.

b) Grupo C

Critérios de inclusão: Pacientes maiores de 18 anos que se apresentem como saudáveis, sem sinais de AR ou qualquer outra desordem imunologicamente mediada ou autoimune;

Critérios de exclusão: Foram excluídos da pesquisa os pacientes que se enquadrem em alguma das seguintes situações: submetidos a radioterapia prévia em região de cabeça e pescoço, infecções crônicas e uso de drogas anticolinérgicas.

Exame clínico

Foram avaliados os pacientes cadastrados no Serviço de Reumatologia do HC-UFPE e com diagnóstico de AR, realizado por um reumatologista de acordo com os critérios da Academia Americana da Reumatologia (1987). Os pesquisadores responsáveis tiveram acesso aos prontuários dos pacientes elegíveis que se enquadraram nos critérios de inclusão.

Os pacientes e controles foram submetidos a exame clínico no Serviço de Estomatologia da UFPE, onde foi aplicado um questionário estruturado para obtenção dos dados sócios demográficos, dados médicos e história da doença atual.

Coleta e processamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas dos pacientes em um tubo de coleta de 4 mL sem anticoagulante. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido no momento da coleta. O tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para separação do soro, e armazenado a -20°C. Também foram obtidas amostras de sangue para realização das dosagens de velocidade de hemossedimentação.

Dosagem sorológica de citocinas

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A foram mensuradas no soro dos indivíduos. Foi utilizado o kit CBA humano Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560484, BD Bioscience, San Jose, CA) segundo as recomendações do fabricante. Os limites de detecção das citocinas foram: IL-2- 2,6 pg/ml; IL-4- 4,9 pg/ml; IL-6- 2,4 pg/ml; IL-10- 4,5 pg/ml; TNF- 3,8 pg/ml; IFN- γ - 3,7 pg/ml; IL-17A- 18,9 pg/ml. A aquisição dos dados foi feita através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v3.0 (Soft Flow Inc).

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Seleção das variantes polimórficas

Foram selecionados tagSNPs do gene *IL6* com base nos padrões de desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*) através do site HapMap (www.hapmap.org). Polimorfismos com alterações funcionais na proteína também foram estudados.

Detecção das variantes polimórficas

Foi utilizada a metodologia do PCR em tempo real, através do sistema TAQMAN®, para detecção das mutações SNPs, que consiste de sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para se complementar aos alelos em estudo.

Todas as sondas e primers utilizados nesse estudo estavam disponíveis para o uso em pesquisa de caráter científico no site do SNP500 (<http://snp500cancer.nci.nih.gov>), assim como, os ensaios e protocolos, os quais já foram previamente validados. Para realização desta técnica foi utilizado o PCR em tempo real Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Austrália), disponível em nosso laboratório.

Análises estatísticas

Os dados foram armazenados em computador no programa SPSS Statistics v.17.0. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição normal das variáveis contínuas. Comparações entre dois grupos foram realizadas com o teste Mann-Whitney. Para comparações entre mais de dois grupos, Kruskal-Wallis foi aplicado. A existência de associações entre variáveis categóricas foi avaliada pelos testes Qui-quadrado de Pearson e exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. A magnitude destas associações foi estimada como Odds ratios (OR), utilizando intervalos de confiança de 95%. Os valores de Odds ratio foram ajustados de acordo com as possíveis variáveis de confusão através de regressão logística multivariada.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 01 - Citocinas na artrite reumatoide: Associação com atividade da doença e função das glândulas exócrinas

RESUMO

Objetivo. Identificar níveis séricos das citocinas Th1, Th2 e Th17 e verificar suas correlações com a atividade da AR bem como com a função de glândulas exócrinas.

Métodos. A amostra do estudo incluiu 136 mulheres. Entre as participantes, 98 apresentavam diagnóstico de AR e 38 eram indivíduos saudáveis. Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação clínica e as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A foram medidas no soro dos indivíduos.

Resultados. Os indivíduos com AR apresentaram níveis significativamente maiores de TNF ($p = 0,005$), IL-2 ($p = 0,002$), IL-4 ($p = 0,002$) e IL-6 ($p < 0,0001$) em comparação com os controles saudáveis. Indivíduos com AR e sinais sicca apresentaram níveis maiores de IL-2 ($p=0,045$), TNF ($p=0,002$) e IL-10 ($p=0,032$) em comparação aos indivíduos com AR sem esses sinais. Níveis aumentados de TNF e IL-2 estiveram relacionados aos sinais/sintomas sicca e a IL-6 apresentou associação com a atividade da AR e incapacidade funcional moderada/grave.

Conclusão. A AR apresenta um perfil multicitocinas e a IL-6 pode ser considerada uma citocina importante no contexto da atividade da doença. A elevação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias está associada a sintomas extra-articulares da AR.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide. Citocinas.

ABSTRACT

Objective. To identify the serum levels of Th1, Th2 and Th17 cytokines, and verify their correlations with RA activity and with the function of exocrine glands.

Methods. The study sample comprised 136 women. Among the participants, 98 presented a diagnosis of RA and 38 were healthy individuals. All the individuals were submitted to clinical evaluation and the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A were measured in the serum of the individuals.

Results. Individuals with RA presented significantly higher levels of TNF ($p=0.005$), IL-2 ($p=0.002$), IL-4 ($p=0.002$) and IL-6 ($p<0.0001$) when compared with the healthy controls. Individuals with RA and sicca had higher levels of IL-2 ($p = 0.045$), TNF ($p = 0.002$) and IL-10 ($p = 0.032$) compared to RA subjects without these signs. Increased levels of TNF and IL-2 were related to sicca signs/symptoms and IL-6 was associated with RA activity and presence of moderate to severe functional disability.

Conclusion. RA presented a multicytokine profile, and IL-6 may be considered an important cytokine in the context of disease activity. Elevated serum levels of pro-inflammatory cytokines are associated with extra-articular RA symptoms.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. Cytokines.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune sistêmica que afeta principalmente as articulações periféricas. A prevalência de AR é de cerca de 0,5-1% da população de regiões desenvolvidas e o início é mais frequente na faixa etária de 40-50 anos. Embora a doença possa afetar indivíduos de ambos os sexos, as mulheres são cerca de três vezes mais propensas que os homens (Bax *et al.*, 2011). A patogênese exata da AR permanece desconhecida, embora fortes evidências sugiram o envolvimento de citocinas na progressão da doença. Sabe-se que as citocinas desempenham um papel fundamental em vários processos inflamatórios, destruição articular e comorbidades associadas à AR (Brennan e McInnes, 2008). As principais manifestações extra-articulares da AR incluem: vasculite, neuropatia, pericardite, ceratoconjuntivite seca, esclerite, episclerite, ceratite ulcerativa periférica, glomerulonefrite, doença reumatoide pulmonar, amiloidose e nódulos reumatoides (Turesson e Jacobsson, 2004). Dentre as manifestações extra-articulares, os sintomas de secura bucal parecem estar associados à atividade da doença e ao estado de saúde dos pacientes (Uhlig *et al.*, 1999).

O desenvolvimento da AR decorre de uma sequência de eventos patológicos que evoluem a partir da perda da tolerância imunológica de células T e B contra autoantígenos, decorrente da influência de fatores genéticos e ambientais (Scott *et al.*, 2011; Svendsen *et al.*, 2013; Tsai e Santamaria, 2013). A resposta é deflagrada contra autoantígenos citrulinados, gerados mediante síntese proteica e que posteriormente associam-se a moléculas de MHC para apresentação a células T (Yoshida e Tanaka, 2014). Os linfócitos T ativados estimulam células B com concomitante produção de autoanticorpos anti-citrulina e mediadores inflamatórios no tecido articular com a participação de diversas células e mediadores como TNF, IL-1, IL-6, IL-7, IL-15, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-21, IL-23, IL-32 e IL-33 (Pablos e Canete, 2013; Yoshida e Tanaka, 2014). Assim, durante o curso da AR as células T e outras células do sistema imunológico são recrutadas para o tecido sinovial, onde se produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e interagem com fibroblastos sinoviais e macrófagos, os quais contribuem para o desenvolvimento da patogênese. Estas incluem as células CD4+ e CD8+, a maioria com um fenótipo ativado. A AR foi classicamente considerada uma doença mediada por Th1, mas evidências atuais indicam envolvimento de Th2, Th17 e células Treg. No entanto, ainda não está claro se estas são subpopulações realmente separadas ou se elas representam plasticidade e heterogeneidade dentro da

linhagem Th17. Cada um desses subconjuntos de células atua em fases distintas do curso da doença, para participar na rede complexa de interações célula-célula que governa o início e a progressão da AR, incluindo a liberação de mediadores inflamatórios, indução de proliferação celular, e angiogênese (McInnes e Schett, 2007).

Apesar de fortes evidências sugerirem o envolvimento de citocinas na progressão da doença, os mecanismos de patogênese e padrão de resposta inflamatória predominantes na AR necessitam ser melhor compreendidos, fornecendo assim, subsídios para o desenvolvimento de futuras estratégias no manejo dos pacientes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar níveis séricos de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6), Th2 (IL-4, IL-10) e Th17 (IL-17A), e verificar a associação destas citocinas com a atividade da AR bem como com a função de gândulas exócrinas.

METODOLOGIA

Caracterização da amostra

Foi realizado um estudo transversal, no período de março a setembro de 2015, composto por 136 mulheres com idade maior que 18 anos. Dentre as participantes, 98 apresentavam diagnóstico de AR, e 38 eram saudáveis e faziam parte do grupo controle. Entre os indivíduos com AR, 26 apresentavam fluxo salivar em repouso $<0,1$ ml/min e teste de Schirmer <5 mm/min e fizeram parte do grupo AR/Sicca. Todas as participantes do grupo caso foram provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), e a amostra obtida foi por conveniência. As envolvidas na pesquisa consentiram previamente a sua inclusão no estudo por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, após aprovação do mesmo no CEP-UFPE sob CAAE 43281015.5.0000.5208.

O diagnóstico de AR foi baseado no critério determinado pelo Colégio Americano de Reumatologia (Arnett *et al.*, 1988). Foram excluídas do estudo, pacientes com história de radioterapia na região de cabeça e pescoço, infecção por HIV, sarcoidose, amiloidose, doença do enxerto contra hospedeiro, infecção por HCV e em uso de drogas anticolinérgicas.

Avaliações Clínicas

As participantes do estudo foram submetidas a exame clínico onde foi aplicado um questionário estruturado para obtenção dos dados sócio-demográficos, dados médicos e história da doença atual.

A capacidade funcional foi determinada utilizando o *Health Assessment Questionnaire* (HAQ). O instrumento desenvolvido por Fries *et al.* (1980), e traduzido e validado para o Português por Ferraz *et al.* (1990) avalia o estado funcional de pacientes com AR, ao detectar o nível de dificuldade que os pacientes apresentam ao realizar atividades do dia a dia, e a necessidade de assistência para realizá-las (Fries *et al.*, 1980; Ferraz *et al.*, 1990). Para cada uma das oito categorias, a paciente indicou o grau de dificuldade em quatro possíveis respostas que iam de “nenhuma dificuldade=0” até “incapaz de fazê-lo=3”. A pontuação de cada categoria foi o resultado mais alto de qualquer um dos seus itens. A pontuação final do HAQ foi determinada pela média da pontuação das oito categorias.

Escalas visuais analógicas (EVA) também foram utilizadas, variando de 0 a 100 mm para avaliar a auto percepção do estado geral (EVA de estado geral da doença) e fadiga na semana anterior, informada pelo paciente (Pincus e Sokka, 2003).

Avaliação da atividade da doença

A atividade da doença foi avaliada através do Disease Activity Score 28 (DAS 28). O DAS 28 utiliza 28 articulações para a contagem das articulações dolorosas e edemaciadas, a velocidade de hemossedimentação ou proteína c reativa como marcador inflamatório, além da avaliação global da saúde ou atividade da doença feita pelo próprio paciente em uma escala de 0 a 100 (Van Der Heijde *et al.*, 1990).

De acordo com o resultado obtido, considerou-se o paciente em remissão caso o valor fosse menor que 2,6; entre 2,6 e 3,2 com atividade leve; maior que 3,2 e 5,1 com atividade moderada, e maior que 5,1 com atividade intensa da AR.

Coleta e processamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas dos participantes em um tubo de coleta de 4 mL sem anticoagulante. O tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para separação do soro, e armazenado a -20°C. Também foram obtidas amostras de sangue para realização das dosagens de velocidade de hemossedimentação.

A coleta de saliva para avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR) foi realizada através da obtenção da saliva total não-estimulada. A coleta ocorreu segundo método desenvolvido anteriormente (Navazesh *et al.*, 1992), conforme descrito por Lins e Silva *et al.* (Lins *et al.*, 2016).

Avaliação da concentração de citocinas no soro dos pacientes

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A foram mensuradas no soro dos indivíduos. Foi utilizado o kit CBA humano Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560484, BD Bioscience, San Jose, CA) segundo as recomendações do fabricante. Os limites de detecção das citocinas foram: IL-2- 2,6 pg/ml; IL-4- 4,9 pg/ml; IL-6- 2,4 pg/ml; IL-10- 4,5 pg/ml; TNF- 3,8 pg/ml; IFN- γ - 3,7 pg/ml; IL-17A- 18,9 pg/ml. A

aquisição dos dados foi feita através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v3.0 (Soft Flow Inc).

Análises Estatísticas

Os dados foram armazenados em computador no programa SPSS Statistics v.17.0. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição normal das variáveis contínuas. Comparações entre dois grupos foram realizadas com o teste Mann-Whitney. A existência de associações entre variáveis categóricas foi avaliada pelos testes Qui-quadrado de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características Clínicas

Cento e trinta e seis mulheres foram incluídas no estudo. A idade média do grupo AR (50,76±11,27) e AR/Sicca (54,27±9,47) foi semelhante ao grupo C (52,29±12,20; p=0,823). No momento do recrutamento, 84 indivíduos apresentaram doença articular ativa e 14 indivíduos estavam em remissão de acordo com a pontuação do DAS28. Os indivíduos do grupo AR e AR/Sicca apresentaram maior pontuação no inventário de xerostomia e uma menor produção de lágrima no teste de Schirmer quando comparados ao grupo C (p<0,0001; p=0,017, respectivamente). Ao comparar o grupo AR com AR/Sicca, indivíduos AR/Sicca apresentaram maior pontuação no inventário de xerostomia, fluxo salivar reduzido, menor produção de lágrimas no teste de Schirmer e maior número de articulações edemaciadas quando comparado ao grupo AR (p<0,0001; p<0,0001; p<0,0001; p=0,014, respectivamente) (Tabela 01).

Tabela 01. Características clínicas dos indivíduos com artrite reumatoide e grupo controle.

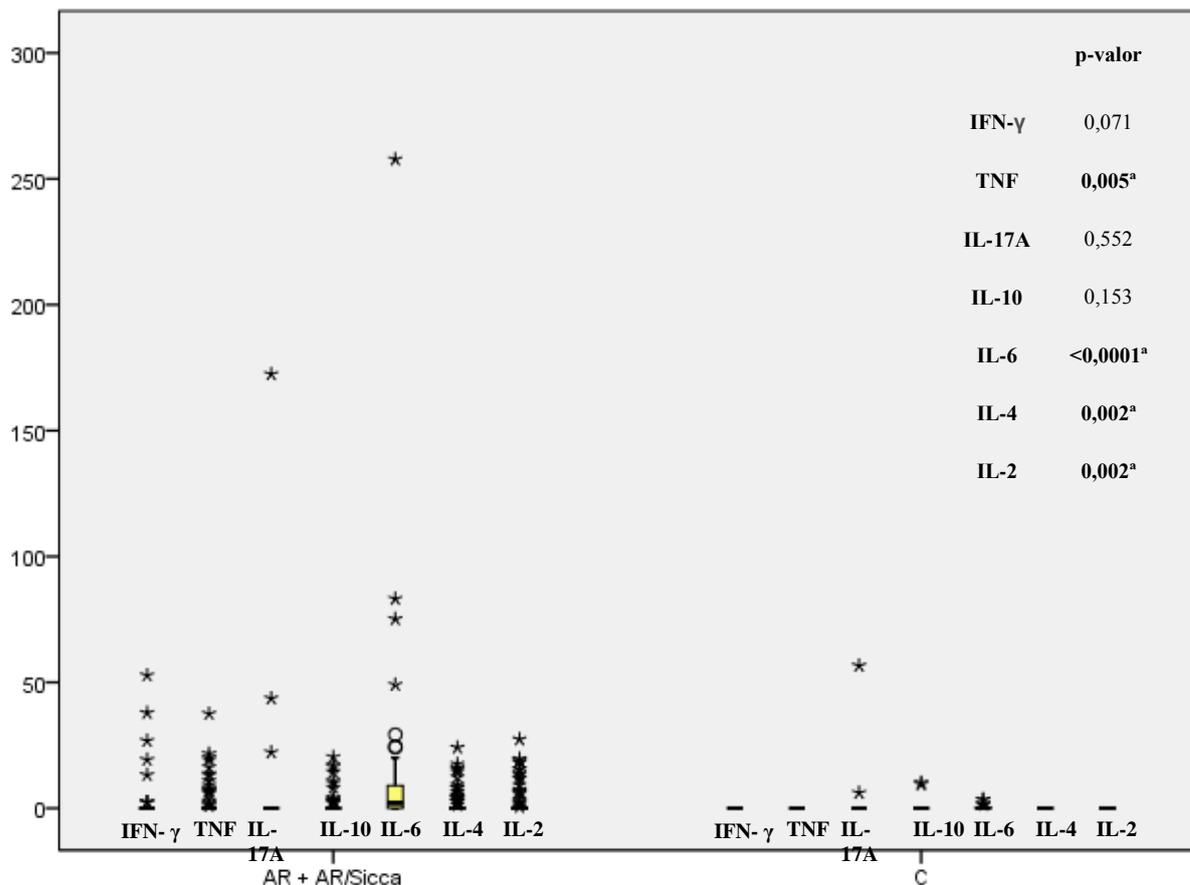
Características clínicas	Média (desvio padrão)			p-valor ¹	p-valor ²
	AR (n=72)	AR/Sicca (n=26)	C (n=38)		
Idade, anos	50,76±11,25	54,27±9,47	52,29±12,20	0,175	0,823
Inventário de xerostomia	21,19±9,19	32,50±10,92	17,39±7,07	<0,0001*	<0,0001*
Fluxo salivar em repouso, ml/min	0,41±0,28	0,07±0,15	0,34±0,28	<0,0001*	0,583
Teste de Schirmer, mm/min	10,17±9,78	2,27±3,81	12,46±11,11	<0,001*	0,017*
Duração da doença, anos	8,99±6,67	10,82±9,37		0,618	
Número de articulações dolorosas	6,61±9,45	8,62±10,37		0,542	
Número de articulações edemaciadas	2,13±3,88	3,96±4,40		0,014*	
EVA do estado geral da doença	52,50±32,88	52,39±28,44		0,871	
EVA de fadiga	52,22±36,05	49,77±36,92		0,900	
<i>Health Assessment Questionnaire</i>	1,22±0,85	1,33±0,89		0,588	
DAS 28	4,33±1,58	4,73±1,85		0,227	
▪ Remissão (< 2.6), n (%)	9 (12,5%)	5 (19,2%)			
▪ Atividade leve (≥ 2.6 to ≤ 3.2), n (%)	10 (13,9%)	1 (3,9%)			
▪ Atividade moderada (> 3.2 to ≤ 5.1), n (%)	32 (44,4%)	7 (26,9%)		0,103#	
▪ Atividade intensa (>5.1), n (%)	21 (29,2%)	13 (50,0%)			

*: Estatisticamente significativo; 1: AR vs. AR/Sicca; 2: AR + AR/Sicca vs. C ; Teste de Mann-Whitney. # Teste do Qui-quadrado

Perfil de Secreção de Citocinas e sua associação a AR

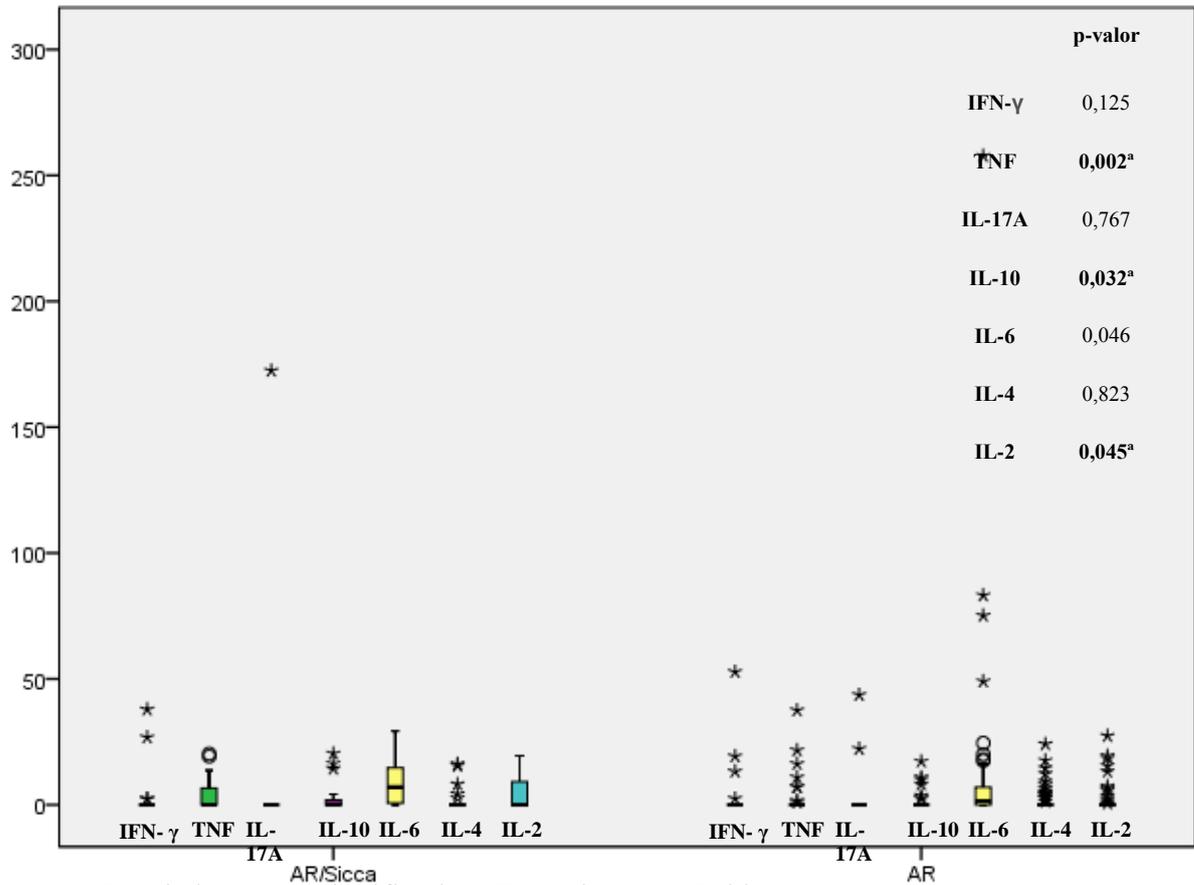
Como mostrado na figura 01, os indivíduos portadores de AR (AR + AR/Sicca) apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-2 ($p=0,002$), TNF ($p=0,005$), IL-4 ($p=0,002$), e IL-6 ($p<0,0001$) quando comparados aos controles saudáveis. Já os indivíduos AR/Sicca apresentaram níveis mais elevados de IL-2 ($p=0,045$), TNF ($p=0,002$), IL-10 ($p=0,032$) quando comparados aos indivíduos com AR.

Figura 01. Comparação entre os níveis séricos das citocinas nos grupos artrite reumatoide e controle



^a:Estatisticamente significativo;Teste de Mann-Whitney.

Figura 02. Comparação entre os níveis séricos das citocinas nos grupos artrite reumatoide/sicca e artrite reumatoide.



^a: Estatisticamente significativo; Teste de Mann-Whitney.

O nível de IL-6 foi maior entre aqueles indivíduos que apresentaram AR ativa ($p=0,019$) e incapacidade moderada/grave ($p=0,014$). O fluxo salivar em repouso reduzido ($<0,1\text{ml/min}$) esteve associado a maiores níveis de TNF e níveis reduzidos de IL-4 estiveram presentes em pacientes com xerostomia. (Tabela 02).

Tabela 02. Associação entre os níveis séricos de citocinas e os sinais/sintomas sicca e atividade da doença em indivíduos com artrite reumatoide.

Variável	N	Média±dp ² (p-valor ¹)						
		IFN- γ	IL-2	TNF	IL-4	IL-10	IL-6	IL-17A
Fluxo salivar								
▪ $\geq 0,1\text{mL}/\text{min}$	68	1,29±6,95	1,79±5,21	1,52±5,75	1,83±4,48	0,81±2,90	10,65±33,87	1,52±5,75
▪ $< 0,1\text{mL}/\text{min}$	30	2,31±8,31 (0,226)	3,63±6,34 (0,141)	3,36±5,98 (0,013*)	1,56±4,25 (0,505)	2,11±5,24 (0,088)	7,30±8,11 (0,068)	5,75±31,48 (0,897)
Xerostomia								
▪ Não	44	0,85±3,50	2,42±6,42	2,62±7,51	2,77±5,44	1,19±3,55	5,39±9,10	1,50±7,32
▪ Sim	54	2,22±9,40 (0,827)	2,30±4,92 (0,339)	1,64±4,06 (0,715)	0,91±3,12 (0,047*)	1,22±4,02 (0,902)	13,08±37,37 (0,175)	3,19±23,46 (0,458)
Teste de Schirmer								
▪ $\geq 5\text{mm}/5\text{min}$	49	1,79±8,15	1,95±5,82	1,76±6,38	2,29±5,09	0,85±3,10	10,13±37,15	1,35±6,94
▪ $< 5\text{mm}/5\text{min}$	49	1,42±6,56 (0,982)	2,77±5,43 (0,120)	2,41±5,32 (0,138)	1,20±3,53 (0,196)	1,57±4,39 (0,245)	9,12±16,30 (0,123)	3,52±24,63 (0,576)
Xeroftalmia								
▪ Não	49	1,84±8,15	2,56±6,47	2,16±6,70	2,37±5,15	1,16±3,40	7,18±14,36	1,35±6,94
▪ Sim	49	1,37±6,56 (0,482)	2,15±4,66 (0,901)	2,00±1,19 (0,971)	1,12±3,42 (0,177)	1,26±4,19 (0,972)	12,07±37,79 (0,343)	3,52±24,63 (0,576)
DAS28								
▪ Remissão	14	0,00±0,00	0,83±3,11	0,97±3,65	1,26±4,71	1,23±3,87	2,30±4,91	1,26±4,70
▪ Atividade	84	1,87±7,93 (0,231)	2,60±5,90 (0,166)	2,27±6,14 (0,269)	1,83±4,36 (0,425)	1,20±3,80 (1,000)	10,85±30,6 (0,019*)	1,82±4,36 (0,475)
HAQ								
▪ Incapacidade leve	43	2,35±9,32	1,90±4,63	1,48±4,17	1,90±4,42	0,91±3,60	3,95±6,36	0,00±0,00
▪ Incapacidade moderada-grave	52	1,08±5,54 (0,756)	2,87±6,45 (0,452)	2,70±7,06 (0,491)	1,72±4,52 (0,967)	1,53±4,06 (0,184)	14,84±38,16 (0,014*)	4,58±24,67 (0,111)

*: Estatisticamente significativo; 1: p-valor do teste de Mann-Whitney; 2: Desvio padrão.

DISCUSSÃO

A identificação de citocinas com um papel diagnóstico e prognóstico em doenças reumáticas autoimunes tem recebido atenção proeminente. No entanto, os resultados têm sido frequentemente contraditórios. Este estudo identificou perfis sorológicos de citocinas Th1, Th2 e Th17, e verificou a associação destas citocinas com a atividade da AR bem como com a função de glândulas exócrinas. A avaliação das sete citocinas foi realizada em um mesmo momento, possibilitando a análise da interação entre elas. Verificou-se que tanto citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias são altamente produzidas em indivíduos com AR, estando a IL-6 especialmente relacionada à forma ativa da doença e à presença de incapacidade funcional moderada/grave, e o TNF relacionado à redução no fluxo salivar.

A AR é uma doença reumática inflamatória com curso progressivo afetando estruturas articulares e extra-articulares, resultando em dor, deficiência, e mortalidade (Birch e Bhattacharya, 2010). A inflamação persistente leva a lesões articulares erosivas e insuficiência funcional na maioria dos pacientes (El Miedany *et al.*, 2008; Combe, 2009). O início da doença não é semelhante em todos pacientes, mas varia em relação ao tipo, número e padrão de comprometimento articular. O curso da doença pode ser também diferente de acordo com a presença ou ausência de diversas variáveis, incluindo fundo genético, a frequência de articulações edemaciadas, de auto-anticorpos no soro e a gravidade do processo inflamatório (Finckh *et al.*, 2006; Gossec *et al.*, 2010).

Embora a fisiopatologia da AR não esteja completamente compreendida, a abundância de células T dentro dos infiltrados mononucleares da membrana sinovial hiperplásica em indivíduos com AR em conjunto com a produção local de citocinas derivadas de células T sugere que estas células sejam importantes na resposta auto-imune da AR. As várias subpopulações de células T contêm células Th1/Th2, células T reguladoras CD4 + CD25^{high} (células Treg) e células Th17 produzindo IL-17. (Weyand e Goronzy, 1997; Raphael *et al.*, 2015). No presente estudo, verificou-se que tanto os perfis Th1, representado por TNF, IL-2, e IL-6, quanto Th2, representado por IL-4, estiveram elevados em indivíduos do grupo caso. A correlação entre as citocinas Th1/Th2/Th17 e os sintomas articulares e extra-articulares reforçam o conceito que AR apresenta um perfil multicitocinas (Burska *et al.*, 2014).

Em doenças auto-imunes, as células Th2 foram inicialmente descritas como anti-inflamatórias baseado em sua capacidade de suprimir doenças mediadas por células Th1 (Berger, 2000; Raphael e Forsthuber, 2012). Ao longo dos anos, no entanto, o papel das

células Th2 na inflamação tecidual foi revisito e relacionado efeitos distintos. Genain et al. informou que, em sagüis com encefalomielite autoimune experimental a produção de citocinas foi substituído de um padrão Th1 por um padrão Th2, e os níveis de auto-anticorpos contra a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos foram reforçados. Eles concluíram que a indução de respostas Th2 pode exacerbar a auto-imunidade, aumentando a produção de auto-anticorpos patogênicos (Genain *et al.*, 1996). De fato, auto-anticorpos contra as proteínas neuronais são frequentemente observadas em pacientes com esclerose múltipla (Antel e Bar-Or, 2003) e os níveis elevados de IL-4, bem como de IFN- γ e TNF, no soro de pacientes com esclerose múltipla durante a fase aguda são positivamente correlacionados com o aumento da desmielinização (Hohnoki *et al.*, 1998). O papel das citocinas de tipo Th2 na patogênese da AR não está claro uma vez que a IL-4 tem apresentado efeitos proinflamatórios e antiinflamatórios em modelos animais de artrite inflamatória (Jacobs *et al.*, 1994; Joosten *et al.*, 1999)

Em nosso estudo, a IL-4 esteve aumentada em indivíduos com AR, e apesar da correlação do perfil Th2 na inflamação tecidual verificada em pesquisas anteriores, parece razoável especular que citocinas pró-inflamatórias podem estimular a expressão de citocinas anti-inflamatórias como um mecanismo de retroalimentação negativa para suprimir o excesso de citocinas pro-inflamatórias em indivíduos com AR. No entanto, estas citocinas anti-inflamatórias podem ainda ser demasiadamente baixas para neutralizar os efeitos deletérios de citocinas pró-inflamatórias na AR progressiva (Isomaki e Punnonen, 1997). Desta forma, a inflamação pode ser descontrolada devido ao antagonismo inadequado de citocinas anti-inflamatórias contra citocinas pró-inflamatórias. Ainda em nosso estudo, níveis elevados de IL-4 constituíram um fator de proteção em relação à xerostomia.

Observou-se ainda neste estudo que o nível de IL-6 foi maior entre aqueles indivíduos que apresentaram AR em atividade e incapacidade funcional moderada/grave. IL-6 é uma citocina pró-inflamatória cuja principal fonte vem de macrófagos ativado e sinoviócitos intra-articulares em portadores de AR (McInnes *et al.*, 2016). Níveis elevados de IL-6 foram observados na membrana sinovial e no plasma de indivíduos com AR em diversos estudos (Sivalingam *et al.*, 2007; Knudsen *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2011), e, conforme observado no presente estudo, tem sido correlacionado com uma maior atividade da doença (Cascao *et al.*, 2010). IL-6 atua nas respostas imunes inata e adaptativa, através da mediação de dano ósseo e cartilaginoso, incluindo a indução de proteínas de fase aguda e estimulação de linfócitos T e B, sinoviócitos e osteoclastos (Kishimoto, 2005; McInnes *et al.*, 2016). Juntamente com TNF,

IL-6 é considerada uma citocina central na patogênese da AR, sendo hierarquicamente importante em relação às demais citocinas envolvidas no processo de perpetuação da inflamação (McInnes *et al.*, 2016). Tanto IL-6 como TNF são atualmente considerados potenciais biomarcadores no contexto da AR (Niu e Chen, 2014), como observado em nosso estudo. TNF está no pico da cascata inflamatória, e o bloqueio do TNF pelos seus anticorpos específicos ou receptores solúveis foi aceito como uma abordagem eficaz para o tratamento biológico várias doenças autoimunes e inflamatórias, em particular a artrite reumatoide (Jian *et al.*, 2016).

Mesmo antes da descoberta de células Th17, foi observada uma elevada expressão de IL-17 em diversas condições inflamatórias/auto-imunes, incluindo esclerose sistêmica (Lock *et al.*, 2002), AR (Kotake *et al.*, 1999), lupus eritematoso sistêmico (Wong *et al.*, 2008; Doreau *et al.*, 2009) e doenças inflamatórias das vias aéreas (Linden *et al.*, 2000), e tem sido implicado na sua patogênese. Em um estudo onde ratos com AR desenvolvem espontaneamente auto-anticorpos, a IL-17 foi encontrada em níveis elevados no soro e foi observado número aumentado de células Th17 no baço (Hsu *et al.*, 2008). Neste modelo, a IL-17 promoveu a formação espontânea de centros germinativos e a geração de anticorpos, de forma independente de antígeno (Hsu *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2008). Cascao *et al.* encontraram uma concentração plasmática elevada de IL-17A em pacientes com AR (Cascao *et al.*, 2010). Por outro lado, tem sido demonstrado que terapias que bloqueiam a IL-17 apresentam grande eficácia no tratamento da psoríase, eficácia limitada na artrite reumatoide e podem agravar o curso de uma doença intestinal inflamatória (McInnes e Schett, 2007; Hueber *et al.*, 2012; Choy *et al.*, 2013). Em nosso estudo, não se observou correlação entre níveis sorológicos de IL-17A e o diagnóstico de AR bem como com o quadro clínico relacionado a essa patologia. Contudo, uma vez que o limiar de detecção de IL-17A do kit utilizado era o mais elevado entre as citocinas estudadas, e diante dos resultados conflitantes encontrados na literatura, sugerimos que novos estudos sejam realizados utilizando metodologias mais sensíveis de detecção.

Nosso estudo apresentou algumas limitações, uma delas foi o tamanho da amostra, que apesar do reduzido número de controles representava um grupo homogêneo. Além disso, as dosagens sorológicas foram feitas em apenas um momento. Ainda assim, foi possível observar um aumento dos níveis séricos no grupo AR e correlacionar com a atividade da doença e sintomas extra-articulares.

Assim, os resultados do nosso estudo sugerem que a AR apresenta um perfil multicitocinas, e que a IL-6 pode ser considerada uma citocina importante no contexto da atividade da AR. Além disso, concluímos que a elevação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias está associada aos sintomas extra-articulares da AR.

REFERÊNCIAS

ANTEL, J. P.; BAR-OR, A. Do myelin-directed antibodies predict multiple sclerosis? **N Engl J Med**, v. 349, n. 2, p. 107-9, Jul 10 2003. ISSN 0028-4793.

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 31, n. 3, p. 315-24, Mar 1988. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAX, M. et al. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Immunogenetics**, v. 63, n. 8, p. 459-66, Aug 2011. ISSN 0093-7711.

BERGER, A. Th1 and Th2 responses: what are they? **Bmj**, v. 321, n. 7258, p. 424, Aug 12 2000. ISSN 0959-8138 (Print) 0959-535x.

BIRCH, J. T., JR.; BHATTACHARYA, S. Emerging trends in diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. **Prim Care**, v. 37, n. 4, p. 779-92, vii, Dec 2010. ISSN 0095-4543.

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, Nov 2008. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

BURSKA, A.; BOISSINOT, M.; PONCHEL, F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 545493, 2014. ISSN 0962-9351.

CASCAO, R. et al. Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 5, p. R196, 2010. ISSN 1478-6354.

CHOY, E. H.; KAVANAUGH, A. F.; JONES, S. A. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. **Nat Rev Rheumatol**, v. 9, n. 3, p. 154-63, Mar 2013. ISSN 1759-4790.

CHUNG, S. J. et al. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. **Yonsei Med J**, v. 52, n. 1, p. 113-20, Jan 2011. ISSN 0513-5796.

COMBE, B. Progression in early rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 23, n. 1, p. 59-69, Feb 2009. ISSN 1521-6942.

DOREAU, A. et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. **Nat Immunol**, v. 10, n. 7, p. 778-85, Jul 2009. ISSN 1529-2908.

EL MIEDANY, Y. et al. Development of a scoring system for assessment of outcome of early undifferentiated inflammatory synovitis. **Joint Bone Spine**, v. 75, n. 2, p. 155-62, Mar 2008. ISSN 1297-319x.

FERRAZ, M. B. et al. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. **J Rheumatol**, v. 17, n. 6, p. 813-7, Jun 1990. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FINCKH, A. et al. Long-term impact of early treatment on radiographic progression in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. **Arthritis Rheum**, v. 55, n. 6, p. 864-72, Dec 15 2006. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591.

FRIES, J. F. et al. Measurement of patient outcome in arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 23, n. 2, p. 137-45, Feb 1980. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GENAIN, C. P. et al. Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate. **Science**, v. 274, n. 5295, p. 2054-7, Dec 20 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

GOSSEC, L. et al. Relative clinical influence of clinical, laboratory, and radiological investigations in early arthritis on the diagnosis of rheumatoid arthritis. Data from the French Early Arthritis Cohort ESPOIR. **J Rheumatol**, v. 37, n. 12, p. 2486-92, Dec 2010. ISSN 0315-162X (Print) 0315-162x.

HOHNOKI, K.; INOUE, A.; KOH, C. S. Elevated serum levels of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha/unelevated serum levels of IL-10 in patients with demyelinating diseases during the acute stage. **J Neuroimmunol**, v. 87, n. 1-2, p. 27-32, Jul 1 1998. ISSN 0165-5728 (Print) 0165-5728.

HSU, H. C. et al. Overexpression of activation-induced cytidine deaminase in B cells is associated with production of highly pathogenic autoantibodies. **J Immunol**, v. 178, n. 8, p. 5357-65, Apr 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

_____. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. **Nat Immunol**, v. 9, n. 2, p. 166-75, Feb 2008. ISSN 1529-2908.

HUEBER, W. et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. **Gut**, v. 61, n. 12, p. 1693-700, Dec 2012. ISSN 0017-5749.

ISOMAKI, P.; PUNNONEN, J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Ann Med**, v. 29, n. 6, p. 499-507, Dec 1997. ISSN 0785-3890 (Print) 0785-3890.

JACOBS, M. J. et al. Role of IL-2 and IL-4 in exacerbations of murine antigen-induced arthritis. **Immunology**, v. 83, n. 3, p. 390-6, Nov 1994. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805.

JIAN, J. et al. Progranulin: A key player in autoimmune diseases. **Cytokine**, Aug 12 2016. ISSN 1043-4666.

JOOSTEN, L. A. et al. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. **Arthritis Res**, v. 1, n. 1, p. 81-91, 1999. ISSN 1465-9905 (Print) 1465-9905.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 1-21, 2005. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582.

KNUDSEN, L. S. et al. Pre-analytical and biological variability in circulating interleukin 6 in healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. **Biomarkers**, v. 13, n. 1, p. 59-78, Feb 2008. ISSN 1354-750X (Print) 1354-750x.

KOTAKE, S. et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **J Clin Invest**, v. 103, n. 9, p. 1345-52, May 1999. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

LINDEN, A.; HOSHINO, H.; LAAN, M. Airway neutrophils and interleukin-17. **Eur Respir J**, v. 15, n. 5, p. 973-7, May 2000. ISSN 0903-1936 (Print) 0903-1936.

LINS, E. S. M. et al. Effect of Xerostomia on the Functional Capacity of Subjects with Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol**, Sep 1 2016. ISSN 0315-162x.

LOCK, C. et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. **Nat Med**, v. 8, n. 5, p. 500-8, May 2002. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956.

MCINNES, I. B.; BUCKLEY, C. D.; ISAACS, J. D. Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 1, p. 63-8, Jan 2016. ISSN 1759-4790.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 429-42, Jun 2007. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733.

NAVAZESH, M.; CHRISTENSEN, C.; BRIGHTMAN, V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. **J Dent Res**, v. 71, n. 7, p. 1363-9, Jul 1992. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NIU, X.; CHEN, G. Clinical biomarkers and pathogenic-related cytokines in rheumatoid arthritis. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 698192, 2014. ISSN 2314-7156.

PABLOS, J. L.; CANETE, J. D. Immunopathology of rheumatoid arthritis. **Curr Top Med Chem**, v. 13, n. 6, p. 705-11, 2013. ISSN 1568-0266.

PINCUS, T.; SOKKA, T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 17, n. 5, p. 753-81, Oct 2003. ISSN 1521-6942 (Print) 1521-6942.

RAPHAEL, I.; FORSTHUBER, T. G. Stability of T-cell lineages in autoimmune diseases. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 8, n. 4, p. 299-301, May 2012. ISSN 1744-666x.

RAPHAEL, I. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 5-17, Jul 2015. ISSN 1043-4666.

SCOTT, I. C. et al. Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 25, n. 4, p. 447-68, Aug 2011. ISSN 1521-6942.

SIVALINGAM, S. P. et al. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. **Ann Acad Med Singapore**, v. 36, n. 2, p. 96-9, Feb 2007. ISSN 0304-4602 (Print) 0304-4602.

SVENDSEN, A. J. et al. On the origin of rheumatoid arthritis: the impact of environment and genes--a population based twin study. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57304, 2013. ISSN 1932-6203.

TSAI, S.; SANTAMARIA, P. MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity. **Front Immunol**, v. 4, p. 321, 2013. ISSN 1664-3224.

TURESSON, C.; JACOBSSON, L. T. Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 33, n. 2, p. 65-72, 2004. ISSN 0300-9742 (Print)0300-9742. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

UHLIG, T. et al. Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 58, n. 7, p. 415-22, Jul 1999. ISSN 0003-4967 (Print)0003-4967. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VAN DER HEIJDE, D. M. et al. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. **Ann Rheum Dis**, v. 49, n. 11, p. 916-20, Nov 1990. ISSN 0003-4967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2256738> >.

WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Med Clin North Am**, v. 81, n. 1, p. 29-55, Jan 1997. ISSN 0025-7125 (Print) 0025-7125.

WONG, C. K. et al. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. **Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 385-93, Jun 2008. ISSN 1521-6616.

YOSHIDA, Y.; TANAKA, T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 698313, 2014.

4.2 Artigo 02 - Avaliação de polimorfismos do *IL6* e sua associação com a artrite reumatoide em mulheres brasileiras

RESUMO

Objetivo. Verificar a associação entre os níveis séricos da IL-6 e os polimorfismos genéticos do *IL6* (rs1800795; rs1800796; rs2069849) em indivíduos com AR, e sua associação com a atividade da doença e função de glândulas exócrinas.

Métodos. A amostra do estudo incluiu 295 mulheres. Entre as participantes, 173 apresentaram diagnóstico de AR e 122 eram saudáveis. As pacientes foram examinadas e foram coletados dados clínicos e amostras de sangue. Os níveis séricos da IL-6 foram mensurados por citometria de fluxo, e os genótipos do *IL6* (rs1800795, rs1800796 e rs2069849) discriminados por PCR em tempo real usando ensaio de genotipagem TaqMan SNP.

Resultados. Indivíduos do grupo AR apresentaram níveis mais elevados da IL-6 ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo controle. Além disso, o nível da IL-6 foi maior entre os indivíduos que apresentaram doença ativa ($p = 0,019$) e incapacidade funcional moderada/grave ($p = 0,014$). Não se observou associação entre os genótipos e os níveis séricos da IL-6. Os genótipos GC/CC do *IL6* (rs1800796) estiveram significativamente associados à presença de AR ($p < 0,0001$; OR 5,83; IC 3,25-10,47) e a xeroftalmia ($p = 0,003$; OR 2,24; IC 1,33-3,77). Não houve associação do *IL6* (rs1800795 e rs2069849) e a presença de AR e as características clínicas estudadas.

Conclusão. A presença do alelo C do *IL6* rs1800796 desempenha um papel importante na patogênese da AR e, se confirmado em outras populações, poderá ser utilizado como um indicador de risco da doença.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide. IL-6. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Objective. To verify the association between serum IL-6 levels and IL6 genetic polymorphisms (rs1800795; rs1800796; rs2069849) in RA subjects, and its association with disease activity and exocrine gland function.

Methods. The study sample included 295 women. Among the participants, 173 had a diagnosis of RA and 122 were healthy. Patients were examined and clinical data and blood samples were collected. Serum IL-6 levels were measured by flow cytometry, and IL6 genotypes (rs1800795, rs1800796 and rs2069849) were performed by real-time PCR using TaqMan SNP genotyping assay.

Results. Subjects in the AR group had higher levels of IL-6 ($p < 0,0001$) when compared to the control group. In addition, IL-6 levels were higher among individuals who had active disease ($p = 0,019$) and moderate/severe functional disability ($p=0,014$). There was no association between genotypes and serum IL-6 concentration. The IL6 GC / CC genotypes (rs1800796) were significantly associated with the presence of RA ($p < 0.0001$, OR 5.83, CI 3.25-10.47) and xerophthalmia ($p = 0.003$, OR 2.24 ; IC 1.33-3.77). There was no association of *IL6* (rs1800795 and rs2069849) and the presence of RA and the clinical characteristics studied.

Conclusion. The presence of the C allele of IL6 rs1800796 plays an important role in the pathogenesis of RA and, if confirmed in other populations, may be used as a risk indicator of the disease.

Keywords: Rheumatoid arthritis. IL-6. Genetic polymorphism.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica caracterizada por poliartrite erosiva simétrica e manifestações sistêmicas extra-articulares. A lesão é concentrada principalmente em tecido sinovial, cartilagem e osso, e a inflamação é a principal causa de deformação articular e mobilidade articular limitada em pacientes com AR (McInnes e Schett, 2011). Os critérios utilizados no diagnóstico de AR são baseados principalmente em manifestações clínicas, testes laboratoriais e estudos de imagem. Embora a etiopatogênese da AR não esteja claramente definida, evidências recentes sugerem que uma combinação de alelos de diversos genes parecem contribuir para a susceptibilidade à AR (Kurko *et al.*, 2013; Li, F. *et al.*, 2014; Li, X. *et al.*, 2014).

Entre os genes envolvidos no desenvolvimento da AR, evidências substanciais têm implicado citocinas pró-inflamatórias, sobretudo a interleucina-6 (IL-6), em sua patogênese (Nile *et al.*, 2008; Perricone *et al.*, 2011; Calabrese e Rose-John, 2014). Um estudo de coorte prospectivo mostrou que indivíduos com elevadas concentrações plasmáticas de IL-6 exibiam progressão radiográfica clinicamente relevante ainda que alcançassem remissão ou baixa atividade da doença através da pontuação de atividade da doença usando a contagem de vinte e oito articulações (DAS28) (Nishina *et al.*, 2013). Além disso, as concentrações séricas de IL-6 tempo-dependentes mostraram estar associadas ao dano estrutural independentemente do DAS28, positividade do fator reumatoide, positividade de anticorpos anti-proteínas citrulinadas, tratamento usado e proteína C reativa em indivíduos com AR precoce (Baillet *et al.*, 2015).

Embora tenham sido observadas altas concentrações de IL-6 em pacientes com AR, seus níveis são heterogêneos, e considerados em grande medida determinados geneticamente (Madhok *et al.*, 1993; Robak *et al.*, 1998). Estudos indicam que os polimorfismos de nucleotídeo único -174 G/C (rs1800795) e -572 G/C (rs1800796) da região promotora do gene *IL6* exercem uma influência na transcrição da proteína IL-6, e podem interferir nos níveis séricos de IL-6 em pacientes com AR (Wang *et al.*, 2013).

Apesar de evidências sugerirem o envolvimento da IL-6 na progressão da doença, o perfil genético predominante na AR precisa ser melhor compreendido, fornecendo assim subsídios para o desenvolvimento de futuras estratégias no manejo dos pacientes. Diante disso, o objetivo deste estudo foi verificar a associação entre os polimorfismos genéticos do

IL6 (rs1800795; rs1800796; rs2069849) com os níveis séricos da IL-6, atividade da doença e função de glândulas exócrinas em indivíduos com AR.

METODOLOGIA

Caracterização da amostra

Foi realizado um estudo transversal, no período de julho de 2015 a dezembro de 2016, composto por 295 mulheres com idade maior que 18 anos. Dentre as participantes, 173 apresentavam diagnóstico de AR e 122 eram saudáveis e faziam parte do grupo controle. Todos os indivíduos do grupo caso foram provenientes do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), e a amostra obtida foi por conveniência. As envolvidas na pesquisa consentiram previamente a sua inclusão no estudo por meio de assinatura do TCLE, após aprovação do mesmo no CEP-UFPE sob CAAE 43281015500005208.

O diagnóstico de AR foi baseado no critério determinado pelo Colégio Americano de Reumatologia (Arnett *et al.*, 1988). Foram excluídas do estudo, pacientes com história de radioterapia na região de cabeça e pescoço, infecção por HIV, sarcoidose, amiloidose, doença do enxerto contra hospedeiro, infecção por HCV e em uso de drogas anticolinérgicas.

Avaliações Clínicas

As participantes do estudo foram submetidas a exame clínico onde foi aplicado um questionário estruturado para obtenção dos dados sócio-demográficos, dados médicos e história da doença atual.

A capacidade funcional foi determinada utilizando o *Health Assessment Questionnaire* (HAQ). O instrumento desenvolvido por Fries *et al.* (1980), e traduzido e validado para o Português por Ferraz *et al.* (1990) avalia o estado funcional de pacientes com AR, ao detectar o nível de dificuldade dos pacientes apresenta ao realizar atividades do dia a dia, e a necessidade de assistência para realizá-las (Fries *et al.*, 1980; Ferraz *et al.*, 1990). Para cada uma das oito categorias, a paciente indicou o grau de dificuldade em quatro possíveis respostas que iam de “nenhuma dificuldade=0” até “incapaz de fazê-lo=3”. A pontuação de cada categoria foi o resultado mais alto de qualquer um dos seus itens. A pontuação final do HAQ foi determinada pela média da pontuação das oito categorias. A partir da pontuação obtida, classifica-se em deficiência leve (HAQ de 0 a 1), deficiência moderada (HAQ > 1 a 2), e deficiência grave (HAQ > 2 a 3).

Escalas visuais analógicas (VAS) também foram utilizadas, variando de 0 a 100 mm para avaliar a auto percepção do estado geral (EVA de estado geral da doença) e fadiga na semana anterior, informada pelo paciente (Pincus e Sokka, 2003).

Avaliação da atividade da doença

A atividade da doença foi avaliada através do *Disease Activity Score 28* (DAS 28). O DAS 28 utiliza 28 articulações para a contagem das articulações dolorosas e edemaciadas, a velocidade de hemossedimentação ou proteína C reativa como marcador inflamatório, além da avaliação global da saúde ou atividade da doença feita pelo próprio paciente em uma escala de 0 a 100 (Van Der Heijde *et al.*, 1990).

De acordo com o resultado obtido, considerou-se o paciente em remissão caso o valor fosse menor que 2,6; entre 2,6 e 3,2 com atividade leve; maior que 3,2 e 5,1 com atividade moderada, e maior que 5,1 com atividade intensa da AR.

Coleta e processamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas das participantes em um tubo de coleta de 4 mL sem anticoagulante. O tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para separação do soro, e armazenado a -20°C. Também foram obtidas amostras de sangue para realização das dosagens de velocidade de hemossedimentação.

A coleta de saliva para avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR) foi realizada através da obtenção da saliva total não-estimulada. A coleta ocorreu segundo método desenvolvido anteriormente (Navazesh *et al.*, 1992), conforme descrito por Lins e Silva *et al.* (Lins *et al.*, 2016).

Extração de DNA e genotipagem

A extração de DNA foi realizada usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Os polimorfismos do *IL6* rs1800795, rs1800796 e rs2069849 foram genotipados com discriminação alélica usando PCR em tempo real com um sistema TaqMan (Invitrogen / ThermoFisher). Foram selecionados tagSNPs de cada gene de citocina com base nos padrões

de desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*) através do site HapMap (<http://www.hapmap.org>).

Avaliação da concentração de IL-6 no soro das pacientes

A IL-6 foi mensurada no soro das pacientes com a utilização do kit CBA humano Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560484, BD Bioscience, San Jose, CA) segundo as recomendações do fabricante. O limite de detecção da IL-6 foi de 2,4 pg/ml. A aquisição dos dados foi feita através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v3.0 (Soft Flow Inc).

Análises Estatísticas

Os dados foram armazenados em computador no programa SPSS Statistics v.17.0. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição normal das variáveis contínuas. Comparações entre dois grupos foram realizadas com o teste Mann-Whitney. A existência de associações entre variáveis categóricas foi avaliada pelos testes Qui-quadrado de Pearson e Exato de Fischer. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características Clínicas

Duzentos e noventa e cinco mulheres foram incluídas no estudo. As participantes do grupo AR apresentaram uma média de idade de $52,92 \pm 11,40$ anos, semelhante ao grupo C ($52,84 \pm 11,93$ anos; $p=0,792$). No momento do recrutamento, 148 indivíduos apresentaram doença articular ativa e 25 indivíduos estavam em remissão de acordo com a pontuação do DAS28 (Tabela 01).

Tabela 01. Características clínicas dos indivíduos com artrite reumatoide e grupo controle.

Características clínicas	Média ± desvio padrão		p-valor ¹
	AR (n=173)	C (n=122)	
Idade, anos	52,92±11,40	52,84±11,93	0,792
Inventário de xerostomia	24,04±10,61	19,35±7,72	<0,0001*
Fluxo salivar em repouso, ml/min	0,34±0,29	0,35±0,28	0,786
Teste de Schirmer, mm/min	7,61±8,30	13,68±12,28	<0,0001*
Duração da doença, anos	8,95±7,49		
Articulações dolorosas (n)	7,10±8,91		
Articulações edemaciadas (n)	2,00±3,60		
Estado geral da doença (EVA)	54,68±31,69		
Fadiga (EVA)	50,78±34,97		
<i>Health Assessment Questionnaire</i>	1,28±0,88		
DAS 28	4,40±1,62		
Remissão (<2,6), n (%)	25 (14,5%)		
Atividade leve ($\geq 2,6$ a $\leq 3,2$), n (%)	17 (9,8%)		
Atividade moderada ($> 3,2$ a $\leq 5,1$), n (%)	72 (41,6%)		
Atividade intensa ($> 5,1$), n (%)	59 (34,1%)		

*: Estatisticamente significativo; 1: p-valor do teste de Mann Whitney.

Associação entre os níveis séricos da IL-6 e as características clínicas

Os níveis séricos da IL-6 estiveram aumentados em indivíduos com doença ativa ($p=0,019$), e incapacidade funcional moderada-grave ($p=0,014$). Não houve associação dos níveis da interleucina com as distribuições genótípicas avaliadas (Tabela 02).

Tabela 02. Associação entre os níveis séricos de IL-6 e as características clínicas de indivíduos com artrite reumatoide.

Característica clínica	N	IL-6 Média ± desvio padrão	p-valor ¹
Diagnóstico			
▪ Controle	38	0,40±0,85	<0,0001*
▪ AR	98	9,63±28,54	
Fluxo Salivar em Repouso			
▪ $\geq 0,1\text{mL}/\text{min}$	68	10,65±33,87	0,068
▪ $< 0,1\text{mL}/\text{min}$	30	7,30±8,11	
Xerostomia			
▪ Não	44	5,39±9,10	0,175
▪ Sim	54	13,08±37,37	
Teste de Schirmer			
▪ $\geq 5\text{mm}/5\text{min}$	49	10,13±37,15	0,123
▪ $< 5\text{mm}/5\text{min}$	49	9,12±16,30	
Xeroftalmia			
▪ Não	49	7,18±14,36	0,343
▪ Sim	49	12,07±37,79	
DAS28			
▪ Remissão	14	2,31±4,91	0,019*
▪ Atividade	84	10,85±30,62	
HAQ			
▪ Incapacidade leve	43	3,95±6,36	0,014*
▪ Incapacidade moderada/grave	52	14,84±38,16	
Rs1800795			
▪ GG	58	5,82±11,94	0,239
▪ GC/CC	40	15,15±42,00	
Rs1800796			
▪ GG	68	11,40±33,88	0,560
▪ GC/CC	30	5,61±7,00	
Rs2069849			
▪ CC	64	11,26±34,83	0,479
▪ CT/TT	34	6,55±7,96	

*: Estatisticamente significativo; 1: p-valor do teste de Mann Whitney.

Distribuição genotípica dos polimorfismos do *IL6*

A distribuição genotípica do *IL6* rs1800796 apresentou associação dos genótipos GC/CC com a presença de AR (OR=5,83; IC=3,25-10,47; $p<0,0001$, Tabela 03). Não houve associação entre a distribuição genotípica do *IL6* rs1800795 e rs2069849 entre os grupos caso e controle ($p=0,532$; $p=0,981$, respectivamente).

Tabela 03. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos do *IL6*

	Genótipo/ Alelo	AR	C	OR	IC 95%	P ¹
rs1800795	GG	103 (63,6%)	69 (59,5%)	1,00	0,52-1,37	0,532
	GC/CC	59 (36,4%)	47 (40,5%)	0,84		
		162 (100%)	116 (100%)			
	G	257 (79,3%)	180 (77,6%)	1,00	0,80-1,14	0,662
	C	67 (20,7%)	52 (22,4%)	0,96		
		324 (100%)	232 (100%)			
GG/GC vs. CC						0,807
GG vs. GC vs. CC						0,738
rs1800796	GG	72 (46,2%)	95 (83,3%)	1,00	3,25-10,47	<0,0001*
	GC/CC	84 (53,8%)	19 (16,7%)	5,83		
		156 (100%)	114 (100%)			
	G	227 (72,8%)	207 (90,8%)	1,00	1,35-1,75	<0,0001*
	C	85 (27,2%)	21 (9,2%)	1,53		
		312 (100%)	228 (100%)			
GG/GC vs. CC						0,575
GG vs. GC vs. CC						<0,0001*
rs2069849	CC	104 (83,9%)	98 (83,8%)	1,00	0,50-1,97	0,981
	CT/TT	20 (16,1%)	19 (16,2%)	0,99		
		124 (100%)	117 (100%)			
	C	228 (91,9%)	215 (91,9%)	1,00	0,52-1,91	0,982
	T	20 (8,1%)	19 (18,1%)	0,99		
		248 (100%)	234 (100%)			
CC vs. CT vs. TT						0,981

*Estatisticamente significativo; 1: p-valor do teste de Qui-quadrado.

Associação entre o polimorfismo do *IL6* e as características clínicas

Dentre as características clínicas analisadas, a xeroftalmia mostrou-se associada aos genótipos GC/CC do *IL6 rs1800796* (OR=2,24; IC=1,33-3,77; p=0,003). Os demais genótipos não apresentaram associação com as características clínicas (Tabela 04).

Tabela 04. Associação entre os genótipos do *IL6* (rs1800796) e as características clínicas estudadas

Característica clínica	GC/CC	GG	OR	IC 95%	p-valor ¹
Fluxo Salivar em Repouso					
▪ $\geq 0,1\text{mL}/\text{min}$	88 (85,4%)	133 (80,1%)	1,00	0,35-1,34	0,326
▪ $< 0,1\text{mL}/\text{min}$	15 (14,6%) (100%)	33 (19,9%) (100%)	0,69		
Xerostomia					
▪ Não	62 (60,2%)	114 (68,3%)	1,00	0,85-2,37	0,190
▪ Sim	41 (39,8%) (100%)	53 (31,7%) (100%)	1,42		
Teste de Schirmer					
▪ $\geq 5\text{mm}/5\text{min}$	65 (65,7%)	110 (65,9%)	1,00	0,60-1,70	0,972
▪ $< 5\text{mm}/5\text{min}$	34 (34,3%) (100%)	57 (34,1%) (100%)	1,00		
Xeroftalmia					
▪ Não	58 (56,3%)	124 (74,3%)	1,00	1,33-3,77	0,003*
▪ Sim	45 (43,7%) (100%)	43 (25,7%) (100%)	2,24		
DAS28					
▪ Remissão	14 (13,9%)	11 (15,3%)	1,00	0,48-2,63	0,829
▪ Atividade	87 (86,1%) 101 (100%)	61 (84,7%) 72 (100%)	1,12		
HAQ					
▪ Incapacidade leve	39 (39,0%)	33 (47,8%)	1,00	0,77-2,66	0,272
▪ Incapacidade moderada-grave	61 (61,0%) 100 (100%)	36 (52,2%) 69 (100%)	1,43		

*Estatisticamente significativo; 1: p-valor do teste de Qui-quadrado.

DISCUSSÃO

A IL-6 é uma citocina de fase aguda que contribui para a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos e lesões teciduais por induzir respostas imunológicas e hematopoiéticas. No entanto, a produção persistente e desregulada de IL-6 pode levar ao desenvolvimento de doenças imunomediadas e tem um papel crucial na patogênese da AR. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que verificou a associação entre a presença de AR e os níveis séricos de IL-6 e polimorfismos genéticos do *IL6* em uma população de brasileiras. Além disso, este estudo verificou a associação desta citocina às características clínicas presentes na artrite. Os resultados sugerem que níveis aumentados de IL-6 e a presença dos genótipos GC/CC do *IL6* rs1800796 estão associados à presença de AR, bem como ao envolvimento funcional e maior atividade da doença.

A AR é uma doença inflamatória sistêmica crônica caracterizada por alterações simétricas e destrutivas no osso e cartilagem das articulações afetadas. Muito embora a etiologia da AR não tenha sido totalmente compreendida, sabe-se que a desregulação imunológica por citocinas inflamatórias desempenham um papel chave em seu desenvolvimento (Feldmann e Maini, 2001; Yoshida e Tanaka, 2014). A IL-6 é uma citocina com diferentes atividades pleiotrópicas e sua produção desregulada está associada aos sintomas clínicos e achados laboratoriais anormais da AR (Yoshizaki *et al.*, 1998), sendo responsável pela indução de proteínas de fase aguda e estimulação de células T e B, sinoviócitos e osteoclastos. Sabe-se que a IL-6 funciona como um importante mediador das manifestações sistêmicas e locais da AR (Nishimoto e Kishimoto, 2006), e o uso terapêutico de inibidores desta citocina, como o tocilizumabe, tem se mostrado uma estratégia bem sucedida no controle da inflamação e danos teciduais da AR (Smolen *et al.*, 2016). De fato, grande quantidade de IL-6 é encontrada no soro e líquido sinovial de pacientes com AR (Chung *et al.*, 2011; Perricone *et al.*, 2011; Calabrese e Rose-John, 2014; Yoshida e Tanaka, 2014), e a desregulação da IL-6 desempenha um papel fundamental na inflamação da AR e está envolvida em várias manifestações clínicas comuns associadas à atividade da doença (Nishimoto e Kishimoto, 2006; Liu *et al.*, 2015). No presente estudo, a IL-6 se mostrou associada à doença ativa e incapacidade funcional moderada-grave.

Polimorfismos na região promotora do gene *IL6* podem ser responsáveis por alterações na atividade transcricional e expressão de IL-6 no tecido sérico e sinovial, o que, por sua vez, pode levar a uma maior inflamação e, portanto, afetar o estado clínico dos

pacientes com AR (Fishman *et al.*, 1998). Entre os sítios polimórficos descritos na região promotora do gene *IL6*, existem dois polimorfismos que parecem influenciar a síntese da citocina: -174G/C (rs1800795) e -572G/C (rs1800796). Estes polimorfismos consistem em uma única mudança de nucleotídeo de guanina (G) para citosina (C) nas posições -174 e -572 na região promotora, respectivamente (Zavaleta-Muniz *et al.*, 2013), e têm sido associados à susceptibilidade à AR. No entanto, resultados conflitantes foram observados em diferentes populações (Arman *et al.*, 2012; Li, F. *et al.*, 2014).

Sabe-se que a sequência genômica do *IL6* é altamente polimórfica, e o SNP -174G/C (rs1800795) é uma das variáveis mais frequentemente avaliadas (Belluco *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2014). Além do rs1800795, avaliamos o rs1800796 e o rs2069849 por estarem em desequilíbrio de ligação. Nossos resultados não mostraram associação dos polimorfismos do *IL6* rs1800795 e rs2069849 com a presença de AR nem com as características clínicas estudadas. Com relação ao rs1800795, resultados semelhantes foram encontrados em indivíduos turcos, macedonianos e britânicos (Palomino-Morales *et al.*, 2009; Trajkov *et al.*, 2009; Arman *et al.*, 2012). Por outro lado, a presença do alelo C nesta região aumentou a susceptibilidade a AR na população chinesa (Li, F. *et al.*, 2014; Li, X. *et al.*, 2014). Ao melhor do nosso conhecimento, nenhum outro estudo avaliou o polimorfismo do *IL6* rs2069849 em indivíduos com AR.

Em relação ao polimorfismo do *IL6* rs1800796, observou-se que os genótipos GC/CC estiveram significativamente associados à presença da AR e da xerofthalmia. Em contraste com os nossos resultados, outros estudos (Lo *et al.*, 2008; Arman *et al.*, 2012; Li, F. *et al.*, 2014; Amr *et al.*, 2016) não encontraram associação entre o polimorfismo desta região e a presença de artrite. Entretanto, assim como nosso estudo, Li *et al.* (2014) e Amr *et al.* (2016) encontraram que o genótipo mais prevalente nos indivíduos com AR foi GC. Diferenças de fatores genéticos e ambientais nos grupos étnicos podem ser as prováveis razões para resultados contraditórios entre diferentes populações. Estudos que avaliaram a secura ocular observaram níveis aumentados de citocinas e marcadores pró-inflamatórios, como IL-6 e TNF, nas lágrimas e superfície ocular dos pacientes (Shimmura *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2003). A contribuição de células T para a imunopatogênese da secura ocular é apoiada por estudos que mostraram um aumento da infiltração de células T na conjuntiva de seres humanos e animais (Mathers *et al.*, 1993; Gendler e Spicer, 1995; Craig e Tomlinson, 1997).

Apesar dos genótipos GC/CC do *IL6* rs1800796 terem sido associados à presença de AR, não houve relação entre estes genótipos e os níveis séricos da IL-6. Muitos SNPs podem

simplesmente representar marcadores genômicos para outras variantes genéticas mais funcionalmente relevantes no desequilíbrio de ligação. Essas observações devem ser obviamente confirmadas em outras populações. Sabe-se também que além dos genes, outros fatores de confusão, como o índice de massa corporal, idade, regimes de drogas e fatores ambientais também apresentam um impacto nos níveis circulantes de IL-6, o que pode dificultar a interpretação dos resultados relativos à associação entre o nível de IL-6 e o risco de AR (Li *et al.*, 2016).

Nosso estudo apresentou algumas limitações, uma delas foi o tamanho da amostra. No entanto nossos resultados mostraram uma importante associação entre a presença do alelo C do *IL6* rs1800796 e a presença de artrite reumatoide. Portanto, estudos adicionais com populações maiores são importantes para confirmar nossos achados. Outras limitações incluem o caráter observacional do estudo que não pode provar causalidade, pode servir apenas para a geração de hipóteses. Além disso, as dosagens sorológicas de IL-6 estavam disponíveis apenas para metade dos pacientes. Ainda assim, essa amostra foi suficiente para mostrar níveis significativamente aumentados de IL-6 entre os portadores de doença ativa e incapacidade funcional moderada-grave.

Diante do exposto, nossos resultados sugerem que a presença do alelo C do *IL6* rs1800796 desempenha um papel importante na patogênese da AR, e níveis aumentados de IL-6 estão relacionados a atividade da doença e incapacidade funcional. Estes achados requerem confirmação por estudos longitudinais que avaliem a utilidade dos polimorfismos do *IL6* como biomarcadores genéticos da doença, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de futuras estratégias no manejo dos pacientes de acordo com a sua individualidade.

REFERÊNCIAS

AMR, K.; EL-AWADY, R.; RASLAN, H. Assessment of the -174G/C (rs1800795) and -572G/C (rs1800796) Interleukin 6 Gene Polymorphisms in Egyptian Patients with Rheumatoid Arthritis. **Open Access Maced J Med Sci**, v. 4, n. 4, p. 574-577, Dec 15 2016. ISSN 1857-9655 (Print) 1857-9655.

ARMAN, A. et al. Lack of association between IL-6 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Turkish population. **Rheumatol Int**, v. 32, n. 7, p. 2199-201, Jul 2012. ISSN 0172-8172.

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 31, n. 3, p. 315-24, Mar 1988. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAILLET, A. et al. Evaluation of serum interleukin-6 level as a surrogate marker of synovial inflammation and as a factor of structural progression in early rheumatoid arthritis: results from a French national multicenter cohort. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 67, n. 7, p. 905-12, Jul 2015. ISSN 2151-464x.

BELLUCO, C. et al. -174 G>C polymorphism of interleukin 6 gene promoter affects interleukin 6 serum level in patients with colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 6, p. 2173-6, Jun 2003. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

CALABRESE, L. H.; ROSE-JOHN, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 12, p. 720-7, Dec 2014. ISSN 1759-4790.

CHUNG, S. J. et al. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. **Yonsei Med J**, v. 52, n. 1, p. 113-20, Jan 2011. ISSN 0513-5796.

CRAIG, J. P.; TOMLINSON, A. Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation. **Optom Vis Sci**, v. 74, n. 1, p. 8-13, Jan 1997. ISSN 1040-5488 (Print) 1040-5488.

FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 163-96, 2001. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582.

FERRAZ, M. B. et al. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. **J Rheumatol**, v. 17, n. 6, p. 813-7, Jun 1990. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, v. 102, n. 7, p. 1369-76, Oct 01 1998. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

FRIES, J. F. et al. Measurement of patient outcome in arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 23, n. 2, p. 137-45, Feb 1980. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GENDLER, S. J.; SPICER, A. P. Epithelial mucin genes. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 607-34, 1995. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278.

KURKO, J. et al. Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 45, n. 2, p. 170-9, Oct 2013. ISSN 1080-0549.

LI, B. et al. Circulating interleukin-6 and rheumatoid arthritis: A Mendelian randomization meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 23, p. e3855, Jun 2016. ISSN 0025-7974.

LI, F. et al. Association between interleukin-6 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Chinese Han population: a case-control study and a meta-analysis. **Sci Rep**, v. 4, p. 5714, Jul 17 2014. ISSN 2045-2322.

LI, X. et al. The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 265435, 2014.

LINS, E. S. M. et al. Effect of Xerostomia on the Functional Capacity of Subjects with Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol**, Sep 1 2016. ISSN 0315-162x.

LIU, X.; TEICHTAHL, A. J.; WICKS, I. P. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis - from the laboratory to the bedside. **Curr Pharm Des**, v. 21, n. 17, p. 2187-97, 2015. ISSN 1381-6128.

LO, S. F. et al. Cytokine (IL-6) and chemokine (IL-8) gene polymorphisms among rheumatoid arthritis patients in Taiwan. **Clin Exp Rheumatol**, v. 26, n. 4, p. 632-7, Jul-Aug 2008. ISSN 0392-856X (Print) 0392-856x.

MADHOK, R. et al. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. **Ann Rheum Dis**, v. 52, n. 3, p. 232-4, Mar 1993. ISSN 0003-4967 (Print) 0003-4967.

MANDAL, S.; ABEBE, F.; CHAUDHARY, J. -174G/C polymorphism in the interleukin-6 promoter is differently associated with prostate cancer incidence depending on race. **Genet Mol Res**, v. 13, n. 1, p. 139-51, Jan 10 2014. ISSN 1676-5680.

MATHERS, W. D.; BINARAO, G.; PETROLL, M. Ocular water evaporation and the dry eye. A new measuring device. **Cornea**, v. 12, n. 4, p. 335-40, Jul 1993. ISSN 0277-3740 (Print) 0277-3740.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 23, p. 2205-19, Dec 8 2011. ISSN 0028-4793.

NAKAMURA, S. et al. Protective effect of D-beta-hydroxybutyrate on corneal epithelia in dry eye conditions through suppression of apoptosis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 11, p. 4682-8, Nov 2003. ISSN 0146-0404 (Print) 0146-0404.

NAVAZESH, M.; CHRISTENSEN, C.; BRIGHTMAN, V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. **J Dent Res**, v. 71, n. 7, p. 1363-9, Jul 1992. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NILE, C. J. et al. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 9, p. 2686-93, Sep 2008. ISSN 0004-3591.

NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Interleukin 6: from bench to bedside. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 2, n. 11, p. 619-26, Nov 2006. ISSN 1745-8382 (Print) 1745-8382.

NISHINA, N. et al. Reduction of plasma IL-6 but not TNF-alpha by methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: a potential biomarker for radiographic progression. **Clin Rheumatol**, v. 32, n. 11, p. 1661-6, Nov 2013. ISSN 0770-3198.

PALOMINO-MORALES, R. et al. Interleukin-6 gene -174 promoter polymorphism is associated with endothelial dysfunction but not with disease susceptibility in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 27, n. 6, p. 964-70, Nov-Dec 2009. ISSN 0392-856X (Print) 0392-856x.

PERRICONE, C.; CECCARELLI, F.; VALESINI, G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 10, p. 599-608, Aug 2011. ISSN 1568-9972.

PINCUS, T.; SOKKA, T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 17, n. 5, p. 753-81, Oct 2003. ISSN 1521-6942 (Print) 1521-6942.

ROBAK, T. et al. 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. ISSN 0962-9351 (Print) 0962-9351.

SHIMMURA, S. et al. Subthreshold UV radiation-induced peroxide formation in cultured corneal epithelial cells: the protective effects of lactoferrin. **Exp Eye Res**, v. 63, n. 5, p. 519-26, Nov 1996. ISSN 0014-4835 (Print) 0014-4835.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023-2038, Oct 22 2016. ISSN 0140-6736.

TRAJKOV, D. et al. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. **Clin Rheumatol**, v. 28, n. 11, p. 1291-300, Nov 2009. ISSN 0770-3198.

VAN DER HEIJDE, D. M. et al. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. **Ann Rheum Dis**, v. 49, n. 11, p. 916-20, Nov 1990. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2256738>>.

WANG, J. et al. IL-6 pathway-driven investigation of response to IL-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis. **BMJ Open**, v. 3, n. 8, p. e003199, Aug 19 2013. ISSN 2044-6055.

YOSHIDA, Y.; TANAKA, T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 698313, 2014.

YOSHIZAKI, K. et al. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody. **Springer Semin Immunopathol**, v. 20, n. 1-2, p. 247-59, 1998. ISSN 0344-4325 (Print) 0344-4325.

ZAVALETA-MUNIZ, S. A. et al. The -174G/C and -572G/C interleukin 6 promoter gene polymorphisms in mexican patients with rheumatoid arthritis: a case-control study. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 959084, 2013. ISSN 1740-2522.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem que a AR apresenta um perfil multicitocinas, e que a IL-6 pode ser considerada uma citocina importante no contexto da atividade da AR. Além disso, a presença do alelo C do *IL6* rs1800796 desempenha um papel importante na patogênese da AR, e níveis aumentados de IL-6 estão relacionados a atividade da doença e incapacidade funcional. Estes achados requerem confirmação por estudos longitudinais que avaliem a utilidade dos polimorfismos do *IL6* como biomarcadores genéticos da doença, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de futuras estratégias no manejo dos pacientes de acordo com a sua individualidade.

REFERÊNCIAS

AHO, K.; HELIOVAARA, M. Risk factors for rheumatoid arthritis. **Ann Med**, v. 36, n. 4, p. 242-51, 2004. ISSN 0785-3890 (Print) 0785-3890.

BAKER, S. R.; PANKHURST, C. L.; ROBINSON, P. G. Utility of two oral health-related quality-of-life measures in patients with xerostomia. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 34, n. 5, p. 351-62, Oct 2006. ISSN 0301-5661 (Print)0301-5661. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0528.2006.00285.x> >.

BRAAM, P. M. et al. Quality of life and salivary output in patients with head-and-neck cancer five years after radiotherapy. **Radiat Oncol**, v. 2, p. 3, 2007. ISSN 1748-717x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1748-717x-2-3> >.

BURSKA, A.; BOISSINOT, M.; PONCHEL, F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 545493, 2014. ISSN 0962-9351.

CHOY, E. H.; KAVANAUGH, A. F.; JONES, S. A. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. **Nat Rev Rheumatol**, v. 9, n. 3, p. 154-63, Mar 2013. ISSN 1759-4790.

COOPER, N. J. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. **Rheumatology (Oxford)**, v. 39, n. 1, p. 28-33, Jan 2000. ISSN 1462-0324 (Print) 1462-0324.

DE SOUZA, T. R. et al. Th1 and Th2 polymorphisms in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 6, p. 418-26, Jul 2014. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12149> >.

DISSICK, A. et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. **J Periodontol**, v. 81, n. 2, p. 223-30, Feb 2010. ISSN 0022-3492.

HOOVESTOL, R. A.; MIKULS, T. R. Environmental exposures and rheumatoid arthritis risk. **Curr Rheumatol Rep**, v. 13, n. 5, p. 431-9, Oct 2011. ISSN 1523-3774.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat Immunol**, v. 16, n. 5, p. 448-57, May 2015. ISSN 1529-2908.

ISHIJIMA, T. et al. The relationship between salivary secretion rate and masticatory efficiency. **J Oral Rehabil**, v. 31, n. 1, p. 3-6, Jan 2004. ISSN 0305-182X (Print)0305-182x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KAUFMAN, I. et al. Sjogren's syndrome - not just Sicca: renal involvement in Sjogren's syndrome. **Scand J Rheumatol**, v. 37, n. 3, p. 213-8, May-Jun 2008. ISSN 0300-9742 (Print)0300-9742. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/03009740701867323> >.

KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 7, p. 1830-5, Jul 2010. ISSN 0014-2980.

LINS, E. S. M. et al. Effect of Xerostomia on the Functional Capacity of Subjects with Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol**, Sep 1 2016. ISSN 0315-162x.

MAKRYGIANNAKIS, D. et al. Citrullination is an inflammation-dependent process. **Ann Rheum Dis**, v. 65, n. 9, p. 1219-22, Sep 2006. ISSN 0003-4967 (Print) 0003-4967.

MARTINS, R. P. [The state of the art in rheumatology: several historic notes]. **Acta Med Port**, v. Suppl 2, p. S47-55, Nov 1989. ISSN 0870-399X (Print) 0870-399x.

MCINNES, I. B.; BUCKLEY, C. D.; ISAACS, J. D. Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 1, p. 63-8, Jan 2016. ISSN 1759-4790.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 429-42, Jun 2007. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733.

_____. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 23, p. 2205-19, Dec 8 2011. ISSN 0028-4793.

METAWI, S. A. et al. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. **Clin Rheumatol**, v. 30, n. 9, p. 1201-7, Sep 2011. ISSN 0770-3198.

OLIVEIRA, H. F. et al. Serologic profile and clinical markers of Sjogren syndrome in patients with rheumatoid arthritis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 119, n. 6, p. 628-35, Jun 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2015.02.479> >.

OLSSON, A. R.; SKOGH, T.; WINGREN, G. Aetiological factors of importance for the development of rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 33, n. 5, p. 300-6, 2004. ISSN 0300-9742 (Print) 0300-9742.

PABLOS, J. L.; CANETE, J. D. Immunopathology of rheumatoid arthritis. **Curr Top Med Chem**, v. 13, n. 6, p. 705-11, 2013. ISSN 1568-0266.

PACE-BALZAN, A. et al. The Liverpool Oral Rehabilitation Questionnaire: a pilot study. **J Oral Rehabil**, v. 31, n. 6, p. 609-17, Jun 2004. ISSN 0305-182X (Print)0305-182x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01279.x> >.

PICKENS, S. R. et al. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 184, n. 6, p. 3233-41, Mar 15 2010. ISSN 0022-1767.

ROBERTS, C. A.; DICKINSON, A. K.; TAAMS, L. S. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. **Front Immunol**, v. 6, p. 571, 2015. ISSN 1664-3224 (Print)

1664-3224.

SCOTT, I. C. et al. Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 25, n. 4, p. 447-68, Aug 2011. ISSN 1521-6942.

SHORT, C. L. The antiquity of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 17, n. 3, p. 193-205, May-Jun 1974. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023-2038, Oct 22 2016. ISSN 0140-6736.

STOLT, P. et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. **Ann Rheum Dis**, v. 62, n. 9, p. 835-41, Sep 2003. ISSN 0003-4967 (Print)
0003-4967.

SVENDSEN, A. J. et al. On the origin of rheumatoid arthritis: the impact of environment and genes--a population based twin study. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57304, 2013. ISSN 1932-6203.

TOUSSIROT, E.; ROUDIER, J. Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. **Joint Bone Spine**, v. 74, n. 5, p. 418-26, Oct 2007. ISSN 1297-319x.

TSAI, S.; SANTAMARIA, P. MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity. **Front Immunol**, v. 4, p. 321, 2013. ISSN 1664-3224.

TURESSON, C.; JACOBSSON, L. T. Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 33, n. 2, p. 65-72, 2004. ISSN 0300-9742 (Print)0300-9742. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

UHLIG, T. et al. Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 58, n. 7, p. 415-22, Jul 1999. ISSN 0003-4967 (Print)0003-4967. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VAN AMELSFORT, J. M. et al. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 3, p. 732-42, Mar 2007. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591.

WANG, J. et al. IL-6 pathway-driven investigation of response to IL-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis. **BMJ Open**, v. 3, n. 8, p. e003199, Aug 19 2013. ISSN 2044-6055.

WEI, S. T. et al. Serum Levels of IL-6 and TNF-alpha May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. **Med Sci Monit**, v. 21, p. 4030-8, Dec 24 2015. ISSN 1234-1010.

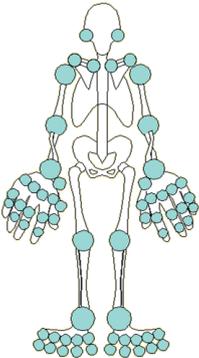
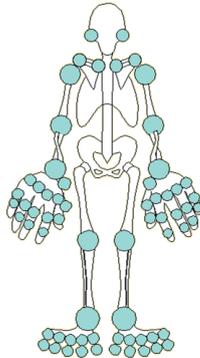
YOSHIDA, Y.; TANAKA, T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 698313, 2014.

YOUNG, A.; KODURI, G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 21, n. 5, p. 907-27, Oct 2007. ISSN 1521-6942 (Print)1521-6942. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2007.05.007> >.

APÊNDICE A – PRONTUÁRIO CLÍNICO

Número da pesquisa:		Prontuário:	
Nome:		Data:	
Data nascimento:		Idade (anos):	
Endereço:			
CEP:		Telefone:	
Profissão:		Sexo: 1. Fem 2. Masc	
Cor: 1. Branca 2. Parda 3. Negra 4. Amarela 5. Indígena			
Tabagismo: 1. sim 2. Não			
Duração do tabagismo:		Carga tabágica:	
Renda Familiar:		= salários mínimos	
Data de início dos sintomas:			
Tempo dos sintomas:		Tempo de diagnóstico:	
meses		meses	
Fator Reumatóide: 1. Positivo 2. Negativo			
Manifestações extra-articulares: 1. Sim 2. Não			
Nódulos subcutâneos 1. Sim 2. Não		Olho seco 1. Sim 2. Não	
Uveíte 1. Sim 2. Não		Vasculites 1. Sim 2. Não	
Anemia 1. Sim 2. Não		Fibrose Pulmonar: 1. Sim 2. Não	
Outras: 1. Sim 2. Não Qual?			
EVA paciente:			
Levando em consideração todas as formas como a artrite afeta sua vida, indique como você está se sentindo neste momento:			

Muito bem		Muito mal	
Score:	mm		
Fadiga:			
Com relação ao cansaço, indique como você tem se sentindo nesta última semana:			

Muito bem		Muito mal	
Score:	mm		
Contagem articular			
			
Dolorosas		Edemaciadas	
Exames		Resultado	
		Data	

VHS (1h)			
PCR			
Fator reumatóide (método)			
FAN			
Anti-CCP			
Anti-Ro			
Anti-La			
Tratamento			
AINH Droga:	Dose:	Início: Tempo:	
Prednisona	Dose	Data de início	Tempo:
Cloroquina	Dose	Data de início	Tempo:
Hidroxicloroquina	Dose	Data de início	Tempo:
Metotrexate	Dose	Data de início	Tempo:
Leflunomida	Dose	Data de início	Tempo:
Sulfassalazina	Dose	Data de início	Tempo:
Anti-TNF início:	Droga:	Dose:	Tempo:
Vitamina D	dose:	Data de início:	Tempo:
Carbonato de cálcio	dose:	Data de início:	Tempo:
Bifosfonato	dose:	Data de início:	Tempo:
Outros:			
Comorbidades			
HAS	1.Sim	2. Não	
Diabetes mellitus	1. Sim	2. Não	
Osteopenia	1. Sim	2. Não	
Osteoporose	1. Sim	2. Não	
Hipotireoidismo	1. Sim	2. Não	
Dislipidemia	1. Sim	2. Não	
Cardiopatía	1. Sim	2. Não	
Depressão	1. Sim	2. Não	
Lúpus	1. Sim	2. Não	
Síndrome de Sjogren	1. Sim	2. Não	
Osteoartrose	1. Sim	2. Não	
Outras:			
Medicamentos em uso:			
DADOS DA DOENÇA DE BASE (AR)			
1 Rigidez matinal pelo menos 1 hora	1. Sim	2. Não	
2 Artrite de 3 ou mais áreas	1. Sim	2. Não	
3 Artrite de articulações das mãos	1. Sim	2. Não	
4 Artrite simétrica	1. Sim	2. Não	

5 Nódulos subcutâneos	1. Sim 2. Não
6 Fator reumatóide positivo	1. Sim 2. Não
7 Alterações radiológicas típicas	1. Sim 2. Não
VASm:	VASp: HAQ:
DAS 28:	CDAI:
Exame Oral	Lesão: 1. Sim 2 –Não Cárie:
Candidose: 1. Sim 2 –Não	Língua despapilada: 1. Sim 2 –Não
Questionário de xerostomia	
1. Sinto minha boca seca <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
2. Tenho dificuldade em comer alimentos secos <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
3. Acordo a noite para beber água <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
4. Minha boca fica seca durante a alimentação <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
5. Eu molho a boca para facilitar a deglutição <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
6. Eu como balas e chicletes doces para aliviar a secura da boca <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
7. Tenho dificuldade em deglutir algumas comidas <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
8. A pele do meu rosto é ressecada <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
9. Sinto meus olhos secos <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
10. Sinto meus lábios secos <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
11. A parte interna do meu nariz é ressecada <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Quase nunca <input type="checkbox"/> ocasionalmente <input type="checkbox"/> quase sempre <input type="checkbox"/> sempre	
Sintomas oculares	
Sensação de corpo estranho:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Ardência ou queimação:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação de olho seco:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Fotofobia (problema de claridade):	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Cansaço visual quando lê ou vê televisão:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Cansaço visual quando lê ou vê televisão:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação que a acuidade visual varia (flutua):	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Produção excessiva de muco:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Sensação de arranhão quando pisca os olhos	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Piora com: ar-condicionado:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
vento:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
fumaça de cigarro:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO – SÍNDROME DE SJOGREN	
1. Sintomas oculares	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>
Você tem desconforto olhos secos de modo diário e persistente nos últimos 3 meses?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>

Você tem sensação recorrente de areia nos olhos?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	
Você utiliza substitutos lacrimais mais de 3 vezes por dia?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	
2. Sintomas orais:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	
Você tem sensação de boca seca diariamente há mais de três meses?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	
Você teve aumento recorrente ou persistente de glândulas salivares na fase adulta?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	
Você sente necessidade de ingerir líquidos para auxiliar a deglutição de alimentos secos?	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	
3. Sinais oculares:	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>	
Teste de Schimer: OD- _____ mm/5min (<5mm em 5 minutos) OE- _____ mm/5min (<5mm em 5 minutos)		
4. Histopatologia:	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>	
Número de focos: _____		
5. Envolvimento de glândula salivar	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>	
Fluxo salivar não estimulado: _____ ml/min (<0.5 ml em 5 min)		
6. Auto-anticorpos:	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>	
Anti SSA:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	Resultado: _____
Anti SSB:	sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/>	Resultado: _____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS – Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Avaliação dos níveis séricos e polimorfismos genéticos de citocinas envolvidas com as respostas Th1, Th2 e Th17 na Síndrome de Sjogren secundária a Artrite Reumatoide**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) **Marília Lins e Silva, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP: 50670-901, Recife - PE – (81) 9783-1115, marilialinsesilva@gmail.com** (inclusive ligações a cobrar). Também participam também desta pesquisa os pesquisadores **Camila Nunes Carvalho** - Telefone para contato: **(81) 9950-3786** e **Thayanara Silva Melo** – Telefone para contato: **(81) 9874-6438**, e está sob a orientação do **Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros** - Telefone: **(81) 9138-1637**, e-mail: **lagueiros@gmail.com**.

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

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Justificativa e objetivos: Através desse estudo e de estudos futuros decorrentes deste, poderemos compreender melhor os mecanismos patológicos associados ao desenvolvimento da Síndrome de Sjögren secundária (SSs) a Artrite Reumatoide. Este estudo visa avaliar a resposta de células responsáveis pela defesa mais específica, chamadas de Th1, Th2, Th17, em pacientes com SS secundária a AR.

Informações: Procedimentos: Será realizado um **questionário** para obtenção dos relativos ao seu nome, endereço e história clínica da doença. O Sr. (a) passará por um **exame clínico** da boca para determinar o fluxo salivar em repouso por meio de um exame simples e não invasivo. Caso haja diminuição significativa da quantidade de saliva ou queixa de boca seca procederemos uma remoção de glândulas salivares menores do lábio inferior por meio de uma pequena cirurgia (**biópsia**) com o objetivo diagnóstico. O Sr. (a) passará por anestesia local, incisão com lâmina de bisturi, remoção de 5 a 6 glândulas salivares menores e sutura da região. O Sr.(a) receberá informações e orientações pós-operatórias e receberá uma prescrição de analgésicos em caso de desconforto relativos ao procedimento cirúrgico. Será coletada uma **amostra de saliva**, na qual, o Sr.(a) deverá expelir toda a saliva por um período de 5 minutos em um recipiente plástico. Uma **amostra de sangue** será coletada com um tubo de coleta com agulha estéril, serão coletados 10 ml – meia colher de sopa – por punção da veia do braço. Será realizado, também, um teste para determinar a **produção de lágrima**, na qual no Sr. (a) será colocada uma fita de papel absorvente na pálpebra de cada olho por 5 minutos. Esta pesquisa não é um ensaio clínico, portanto, não há grupo placebo. Não há métodos alternativos existentes para obtenção da informação desejada nesta pesquisa.

Desconfortos, riscos previsíveis e benefícios esperados: O paciente submetido à pesquisa poderá correr o risco de desconforto leve durante o exame clínico, reações adversas relacionados ao procedimento de biópsia, tais como: alergia ao anestésico, complicações hemorrágicas, complicações pós-operatórias, riscos de hematomas e desconfortos durante a coleta de sangue, e além da possibilidade de se sentirem constrangidos (a) devido às perguntas em relação à sua história médica. Essas situações serão minimizadas pela experiência do examinador, o qual fará o seu exame em local apropriado e estará sob a orientação do professor responsável. Vale ressaltar que todos os procedimentos serão realizados respeitando os critérios de biossegurança necessários. Os pacientes diagnosticados com a Síndrome de Sjogren poderão ser acompanhados no tratamento da secura bucal. O atendimento clínico será realizado pela pesquisadora responsável. Caso necessitem de tratamento odontológico serão orientados (a) a procurar o serviço de Odontologia da UFPE.

Forma de acompanhamento e assistência: Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa serão arquivados no computador pessoal do pesquisador responsável e estarão disponíveis pelo período de no mínimo 5 anos. Os pesquisadores estarão à disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais pessoalmente, por telefone ou e-mail (contato acima).

Garantias: Garantia de esclarecimentos: Os pesquisadores esclarecerão os voluntários quanto a todos os aspectos da pesquisa, antes, durante e após a mesma. Liberdade de recusa à participação ou de retirar o seu consentimento: O Sr. (a) pode escolher não participar de nossa pesquisa, ou desistir da participação, se achar necessário, em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização e sem prejuízo, inclusive do seu atendimento clínico. **Sigilo:** Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo.

Ressarcimento e indenização: Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br**).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Avaliação dos níveis séricos e polimorfismos genéticos de citocinas envolvidas com as respostas Th1, Th2 e Th17 na Síndrome de Sjogren secundária a Artrite Reumatoide**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data _____

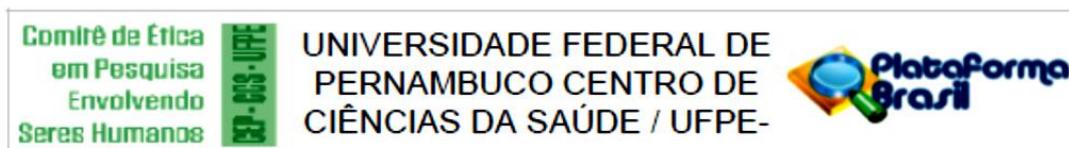
Assinatura do participante: _____

Impressão
Digital
(Opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores)

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS ENVOLVIDAS COM AS RESPOSTAS TH 1, TH 2 E TH 17 NA SÍNDROME DE SJÖGREN SECUNDÁRIA A ARTRITE REUMATOIDE

Pesquisador: Marília Lins e Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43281015.5.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.114.777

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa tem como título: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS ENVOLVIDAS COM AS RESPOSTAS TH 1, TH 2 E TH 17 NA SÍNDROME DE SJÖGREN SECUNDÁRIA A ARTRITE REUMATOIDE.

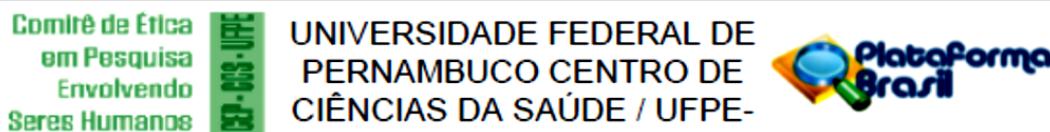
O presente estudo será desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa será realizado um estudo sorológico para a identificação de padrões de expressão de citocinas Th1, Th2 e Th17 associados com a artrite reumatoide associada ou não à síndrome de Sjögren. Em uma segunda etapa será realizado um estudo genético das citocinas associadas na primeira etapa. Serão comparadas as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em grupos de pacientes portadores de artrite reumatoide associada ou não à síndrome de Sjögren.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Identificar perfis sorológicos de citocinas e verificar a associação entre polimorfismos genéticos em portadores de Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide.

Objetivo Secundário: Caracterizar os pacientes com Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide de acordo com suas características clínicas; -Determinar os

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.114.777

níveis séricos de citocinas envolvidas com o perfil Th1, Th2 e Th17 de linfócitos T em pacientes com Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide;-Determinar os níveis séricos de citocinas envolvidas com o perfil Th1, Th2 e Th17 de linfócitos T em indivíduos com artrite reumatoide;- Realizar estudo genético das citocinas identificadas em associação com a Síndrome de Sjögren secundária a artrite reumatoide;- Verificar a

associação dos níveis séricos da citocina com seus respectivos polimorfismos;-Comparar a frequência das variantes alélicas e genotípicas entre pacientes com Síndrome de Sjögren secundária e portadores de artrite reumatoide exclusiva.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O paciente submetido à pesquisa poderá correr o risco de desconforto leve durante o exame clínico, reações adversas relacionados ao procedimento de biópsia, tais como: alergia ao anestésico, complicações hemorrágicas, complicações pós-operatórias, riscos de hematomas e

desconfortos durante a coleta de sangue, e além da possibilidade de se sentirem constrangidos (a) devido às perguntas em relação à sua história médica. Essas situações serão minimizadas pela experiência do examinador, o qual fará o seu exame em local apropriado e estará sob a orientação do professor responsável. Vale ressaltar que todos os procedimentos serão realizados respeitando os critérios de biossegurança necessários.

Benefícios:Os pacientes diagnosticados com a Síndrome de Sjogren poderão ser acompanhados no tratamento da secura bucal. O atendimento clínico será realizado pela pesquisadora responsável. Caso necessitem de tratamento odontológico serão orientados (a) a procurar o serviço de Odontologia da UFPE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho trará um contribuição importante para pacientes que apresentam a Síndrome bem como a comunidade científica.

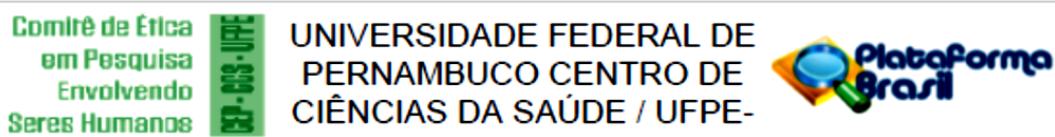
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação adequado e de acordo com as exigências.

Recomendações:

As recomendações é que como relatado o pesquisador responsável quando no procedimento de biopsia sempre esteja presente. Ficando sempre dois profissionais da área com capacidade para resolver qualquer intercorrência.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.114.777

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trabalho em condições de ser realizado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

CEP - CCS - UFPE

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



Continuação do Parecer: 1.114.777

RECIFE, 19 de Junho de 2015

Assinado por:

**Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)**

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepocs@ufpe.br