



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LAURINDO FERREIRA DA ROCHA JUNIOR

**DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS
INTERLEUCINAS 29 E 22 EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Recife
2018

LAURINDO FERREIRA DA ROCHA JUNIOR

**DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS
INTERLEUCINAS 29 E 22 EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadores: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego
Prof^a. Dr^a. Angela Luzia Branco Pinto Duarte

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Rocha Júnior, Laurindo Ferreira da
Determinação da sensibilidade e especificidade das interleucinas 29 e 22 em
pacientes com artrite reumatoide / Laurindo Ferreira da Rocha Júnior. – 2018.

146 f. : il.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta.

Coorientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego Junior. Coorientadora: Ângela
Luzia Branco Pinto Duarte.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.
Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Doenças autoimunes 2. Artrite reumatoide. I. Pitta, Maira Galdino da
Rocha (Orientadora). II. Rego Júnior, Moacyr Jesus Barreto de Melo
(Coorientador). III. Duarte, Ângela Luzia Branco Pinto
(Coorientadora). IV. Título.

616.7227

CDD(22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 276

LAURINDO FERREIRA DA ROCHA JUNIOR

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 18/12/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira Hernandes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Henrique de Ataíde Mariz (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - Hospital das Clínicas

Prof. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Medicina Tropical

*Ao meu pai, Laurindo, e minha mãe, Alzenira, que fizeram parte de
minha construção como ser humano.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À família querida que me deu apoio incondicional para realização desse trabalho: Alzi, Lili, Laurinha, Christianne e Laurindo.

À minha orientadora e amiga Máira Galdino da Rocha Pitta que me ensinou muito em minha vida acadêmica e demonstrou ser de uma paciência ímpar.

Ao grande amigo e coorientador Moacyr Rêgo por não ter desistido de mim.

Ao grande amigo e braço direito Hugo pela ajuda cuja minha gratidão é infinita.

À Dra. Ângela Duarte pela co-orientação e confiança.

À grande amiga Andréa Dantas por ter estado do meu lado em momentos bem difíceis.

Aos pacientes, pela disponibilidade e cumplicidade.

À toda a equipe do LINAT, especialmente Adson, Pablo e Kamila pela cooperação e harmonia.

Ao PPGIT e Paulo Germano pela atenção inquestionável.

A todos os funcionários do Hospital das Clínicas, pelo respeito e ajuda.

A todos os colegas reumatologistas do Hospital das Clínicas: Dra. Ângela, Dra. Fátima, Dra. Cláudia, Dr. Fernando, Aline, Nara, Henrique, Alexandre, Sérgio, Rafaela, André, Vanessa, Ana Raquel, Ila e Camila pelo trabalho e dedicação em conjunto.

A todos os meus amigos que não vejo há muito tempo por estar imbuído de minha construção como profissional e pesquisador.

À professora Suely Lins Galdino (In memoriam), cuja serenidade me servirá de exemplo sempre.

Ao professor, amigo e neurologista Otávio Lins por ter me assistido em momentos de saúde complicados.

Aos colegas de trabalho do IMIP: Henrique, Renata, Mariana, Eliane e Adriana pela imprescindível ajuda.

À família que não inclui irmãos ou pais, incluindo Lourdinha, esposa de meu pai, por terem me auxiliado nos cuidados ao meu pai doente.

À família Pitta: Maíra, Professor Ivan, Marina, Raíssa e Tales, por continuarem me mostrando o mundo da pesquisa em família.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica autoimune inflamatória de envolvimento sistêmico que tem como característica principal o acometimento articular. As citocinas têm sido descritas como biomarcadores na AR e estão diretamente implicadas na patogênese da doença. Atualmente, para o diagnóstico da AR não existe nenhum teste “padrão ouro”. O diagnóstico é feito pelo quadro clínico dos pacientes associado a alterações laboratoriais e presença dos autoanticorpos fator reumatoide e anti-CCP. Este trabalho objetivou determinar a acurácia das interleucinas (ILs) 29 e 22 na identificação de pacientes com AR comparados a pacientes com outras doenças reumatológicas como Esclerose Sistêmica (ES), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Fibromialgia (FM) e Osteoartrite (OA) assim como com indivíduos saudáveis. Os pacientes foram provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A coleta de dados clínico-demográficos foi realizada por questionário específico e os pacientes que preencheram os critérios de inclusão realizaram coleta do sangue periférico. A quantificação das citocinas foi realizada em 135 pacientes com AR, 131 pacientes com LES, 60 pacientes com ES, 29 pacientes com FM, 50 pacientes com OA e 68 controles saudáveis por ELISA. Os níveis medianos de IL-29 mostraram-se aumentados nos pacientes com AR 113.6 pg/ml vs 31.25pg/ml quando comparados aos pacientes sem AR e aos controles saudáveis ($p \leq 0.001$). IL-22 sérica mostrou aumentada (118pg/ml vs. 31.25 para OA, FM, ES e controles saudáveis e 59.29 pg/ml para LES). As medidas de acurácia foram calculadas em relação aos grupos de comparação e o padrão de referência para o diagnóstico foram os critérios de classificação do ACR de 1987 e ACR/EULAR de 2010. A IL-29 mostrou sensibilidade 64.46% e especificidade de 87.31%, área sob a curva de 0.78 e razão de verossimilhança positiva de 5.08. A IL-22 teve sensibilidade de 74.81% e especificidade e 78.14%, área sob a curva de 0.78 e razão de verossimilhança positiva de 3.42. Também foram calculados os pontos de corte ideal para identificação de pacientes com AR. Este estudo foi pioneiro em calcular medidas de acurácia para níveis séricos de citocinas presentes na AR

sugerindo que estas proteínas podem ter papéis como biomarcadores de diagnóstico.

Palavras-chave: Citocinas. Doenças reumáticas. Doenças autoimunes

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune inflammatory disease with systemic involvement and with joint damage as the main characteristic feature. Cytokines have been described as biomarkers in RA and are directly implicated in its pathogenesis. Currently, for RA diagnosis there is no gold standard test. RA diagnosis is mainly based on clinical features associated with abnormal laboratory tests and the presence of the antibodies rheumatoid factor and anti-CCP. The present study aimed to determine the accuracy of the interleukins (IL) 29 and 22 in identifying RA patients compared to patients with other rheumatologic diseases such as Systemic Sclerosis (SSc), Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Fibromyalgia and Osteoarthritis (OA) as well as with healthy controls. Patients were recruited from Hospital das Clínicas at Universidade Federal de Pernambuco. Clinical and demographic data were collected from hospital records or by interview. Patients who fulfilled the inclusion criteria had blood samples collected. Cytokine quantification (ELISA assay) was performed in 135 patients with RA, 131 with SLE, 60 patients with SSc, 29 patients with FM, 50 with OA and 68 healthy controls. The median levels of IL-29 were increased in RA patients compared with all the subjects studied (113.6 pg/ml vs 31.25pg/ml), $p \leq 0.001$. Serum IL-22 was increased compared with OA, FM, SSc and healthy controls (118pg/ml vs. 31.25) as well as with SLE patients (59.29 pg/ml). Accuracy measures were calculated between RA patients compared to the comparison groups and the reference standard for RA diagnosis were the ACR 1987 classification criteria and the ACR/EULAR 2010 classification criteria. IL-29 had sensibility of 64.46% and specificity of 87.31%, the area under the curves (AUC) was 0.78 and positive likelihood ratio (LR) was 5.08. As for IL-22, the pooled sensitivity was 74.81% and specificity was 78.14%, AUC 0.78 and LR was 3.42. We also calculated the optimal cut off values to distinguish RA patients for each cytokine analyzed. This was the first study in RA in which serum levels of the cytokines studied were used for accuracy tests. These findings suggest that the proteins studied may be used as diagnostic biomarkers.

Key Indexing Terms: Cytokines. Rheumatic diseases. Autoimmune diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 – Sinovite de 2 ^a . e 3 ^a . metacarpofalangeanas e punho direitos em paciente com artrite reumatoide atendido no ambulatório de reumatologia do HC UFPE (reproduzido com a permissão do paciente)	24
Figura 2 – Sinovite de tornozelo esquerdo em paciente com artrite reumatoide atendido no ambulatório de reumatologia do HC UFPE (reproduzido com a permissão do paciente)	24
Figura 3 – Evolução da artrite reumatoide. Traduzida para o português de (SMOLEN <i>ET AL.</i> , 2016)	37
Figura 4 – Sinovite na artrite reumatoide. Traduzida para o português de (ALAM <i>ET AL.</i> , 2017)	38

Artigo 2

Figura 1 – Levels of IL-29 in serum of rheumatoid arthritis patients (RA), patients with other rheumatic diseases (non-RA) and normal healthy controls (NHS).	99
Figura 2 – Correlation between serum interleukin 29 levels from RA patients (n=90) and absolute neutrophil counts in patients positive for rheumatoid factor (A) and negative for rheumatoid factor (B).	100
Figura 3 – Receiver operating characteristic (ROC) curve for IL-29 validity for distinguishing RA. (RA – rheumatoid arthritis, NHS - normal healthy subjects).	101

Artigo 3

Figura 1 – Levels of IL-22 in serum from RA-patients, non-RA patients and healthy controls.	113
Figura 2 – Receiver operating characteristic curve for IL-22 validity in rheumatoid arthritis (RA) patients and normal healthy subjects (NHS) (A), RA, NHS and other rheumatic diseases (NON RA) (B), RA and NON RA (C). AUC: area under the curve. CI: confidence interval.	114

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 –	Critérios do colégio americano de reumatologia 1987 para classificação da artrite reumatoide. Adaptado de Da mota et al. (2011) e arnett et al. (1988)	40
Tabela 2 –	Critérios classificatórios para ar 2012 acr/ eular. Adaptado de Da mota et al. (2011) e Aletaha et al. (2010)	41
Tabela 3 –	Representação esquemática de medidas de acurácia. Traduzido de Florkowski (2008)	43

Artigo 1

Tabela 1 –	Characteristics of studies on new antibodies published in the last 5 years	72
Tabela 2 –	Characteristics of the studies on cytokines published in the last five years	73

Artigo 2

Tabela 1 –	Demographic, clinical, and laboratory presentation of the patients with rheumatoid arthritis (RA).	96
Tabela 2 –	Correlations between IL-29 levels and clinical and laboratory characteristics in RA patients.	97
Tabela 3 –	Accuracy of serum IL-29 in distinguishing RA patients from non-RA patients and healthy controls.	98

Artigo 3

Tabela 1 –	Demographic, clinical, and laboratory presentation of the patients with rheumatoid arthritis (RA).	112
Tabela 2 –	Diagnostic performance of serum IL-22 in distinguishing RA patients from non-RA patients and healthy controls.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPA	Anticorpos antiproteínas citrulinadas, do inglês <i>anti-citrullinated protein antibodies</i>
ACR	Colégio Americano de Reumatologia, do inglês <i>American College of Rheumatology</i>
Anti-CCP	Anticorpo antipeptídeo citrulinado, do inglês <i>Cyclic Citrullinated Peptide</i>
AR	Artrite Reumatoide
AUC	Área sob a curva, do inglês <i>area under the curve</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDAI	Índice clínico de atividade de doença, do inglês <i>clinical disease activity index</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAS28	Escore de atividade de doença em 28 articulações, do inglês <i>disease activity score in 28 joints</i>
DCV	Doença cardiovascular
ELISA	Do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EULAR	Liga Europeia contra o Reumatismo, do inglês <i>European League Against Rheumatism</i>
FR	Fator reumatoide
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GWAS	Estudo de Associação Genômica Ampla, do inglês <i>genome-wide association study</i>
HAQ	Do inglês <i>Health Assessment Questionnaire</i>
HC	Hospital das Clínicas
HLA	Antígeno leucocitário humano, do inglês <i>human leucocyte antigen</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	Do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade

MMP	Metaloproteinase de matriz, do inglês <i>matrix metalloproteinase</i>
PAD	Peptil arginina deaminase
PBMCs	Células mononucleares de sangue periférico humano
PCR	Proteína C reativa
ROC	Do inglês, <i>receiver-operating characteristic</i>
Th	T auxiliar, do inglês <i>T helper</i>
TLR	Receptores semelhantes a <i>Toll</i> , do inglês <i>Toll-like receptors</i>
TNF	Do inglês <i>tumor factor of necrosis</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VSH	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo Geral	20
1.1.2	Objetivos Específicos	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	ARTRITE REUMATOIDE: CONCEITO	22
2.2	EPIDEMIOLOGIA	22
2.3	QUADRO CLÍNICO	23
2.4	FISIOPATOGÊNESE DA ARTRITE REUMATOIDE	25
2.4.1	Fatores genéticos	26
2.4.2	Fatores ambientais	27
2.4.3	Fatores hormonais	28
2.5	AUTOANTICORPOS NA ARTRITE REUMATOIDE	28
2.6	INFLAMAÇÃO NA ARTRITE REUMATOIDE	29
2.6.1	A Interleucina 29	31
2.6.2	A Interleucina 22	33
2.6.3	Fases clínicas da artrite reumatoide	36
2.7	DIAGNÓSTICO DA ARTRITE REUMATOIDE	39
2.8	ACURÁCIA DOS ANTICORPOS FATOR REUMATOIDE E ANTI-CCP NA ARTRITE REUMATOIDE	42
2.8.1	Medidas de acurácia	42
2.8.2	Fator reumatoide e Anti-Ccp	43
2.9	ACURÁCIA DE NOVOS ANTICORPOS ANTIPROTEÍNAS CITRULINADAS	45

2.9.1	Anticorpos Anti-SA	45
2.9.2	Anticorpos Anti-Tenascina C	46
2.9.3	Anticorpos Anti-Vimentina	46
3	METODOLOGIA	47
3.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO	47
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE	47
3.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DO GRUPO CONTROLE	48
3.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO PARA TODOS OS INDIVÍDUOS ..	48
3.5	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	48
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4	RESULTADOS	50
4.1	ARTIGO 1: ACCURACY DATA ON NOVEL DIAGNOSTIC BIOMARKERS IN RHEUMATOID ARTHRITIS: BEYOND IMAGE STUDIES	50
4.2	ARTIGO 2: SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF INTERLEUKIN 29 IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND OTHER RHEUMATIC DISEASES	80
4.3	ARTIGO 3: SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF INTERLEUKIN 22 IN RHEUMATOID ARTHRITIS	102
5	DISCUSSÃO	118
6	CONCLUSÕES	126
	REFERÊNCIAS	127
	APÊNDICE A – SUBMISSÃO DE ARTIGO	137
	APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA	138
	APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E	

ESCLARECIDO	142
ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA	145

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma das enfermidades inflamatórias crônicas mais prevalentes (Rudan *et al.*, 2015). Trata-se de uma doença autoimune sistêmica do tecido conjuntivo, que acomete predominantemente as articulações e estruturas periarticulares e tendinosas, podendo levar a destruição óssea e cartilaginosa (Mota, Cruz, Brenola, *et al.*, 2013). A AR deve ser considerada uma síndrome que inclui manifestações extra-articulares, como nódulos reumatoides, comprometimento pulmonar, cardíaco, pleural, neurológico, hematológico e vasculite e, também, está associada a comorbidades sistêmicas (Smolen *et al.*, 2016). Sua epidemiologia demonstra relação entre um aumento crescente do risco de morbidade e mortalidade(Myasoedova *et al.*, 2010).

O risco maior de mortalidade na AR está associado à incidência maior de doença cardiovascular nos pacientes com a doença, que é de 1,5 vezes maior que a população normal (Solomon *et al.*, 2010). A morbidade cardiovascular também se encontra aumentada na doença e está associada ao aumento de casos de enfermidade coronariana, morte súbita, acidente vasculoencefálico, trombose venosa, insuficiência cardíaca, doença vascular periférica, aterosclerose subclínica e disfunção endotelial (Mackey *et al.*, 2017).Estudos apontam que há importante evidência da influência do quadro inflamatório persistente da AR na doença (Sattar *et al.*, 2003).

Outros fatores associados à morbidade e mortalidade na AR incluem as consequências da incapacidade produzida pela doença, das manifestações extra-articulares e complicações ou eventos adversos oriundos do tratamento (Listing *et al.*, 2013). Além disso, há associação com linfoma (Smitten *et al.*, 2008) e amiloidose secundária (Nakamura, 2011). Tais fatores conferem à AR importante causa de custos diretos e indiretos à sociedade (De Azevedo *et al.*, 2008).

A patogênese da AR envolve uma cadeia complexa interativa entre células e citocinas, particularmente no recrutamento, ativação e funções efetoras de células do sistema imune(Siebert *et al.*, 2015). Citocinas e quimiocinas levam à indução da resposta inflamatória e participam da ativação de células endoteliais e atração de células do sistema imune para se

acumularem dentro do compartimento sinovial (McInnes e Schett, 2007). As intervenções terapêuticas atuais na prática clínica claramente demonstram a importância das citocinas para AR, visto que algumas terapias têm citocinas específicas como alvo terapêutico (Mota, Cruz, Brenol, *et al.*, 2013; Siebert *et al.*, 2015).

Além disso, as citocinas são descritas na AR como relevantes biomarcadores (Burska *et al.*, 2014). O conceito de biomarcadores envolve parâmetros que podem ser anatômicos, fisiológicos, bioquímicos, moleculares ou características encontradas em exames de imagem. Apesar de existirem muitos marcadores biológicos descritos na AR, ainda há demanda para a descoberta de novos biomarcadores, principalmente aqueles que estão associados ao diagnóstico da doença (Burska *et al.*, 2014). Atualmente, o diagnóstico da AR é baseado no quadro clínico associado a alterações laboratoriais, como reagentes de fase aguda de inflamação (velocidade de hemossedimentação -VSH e proteína C reativa – PCR) e a presença de autoanticorpos, tais como o Fator reumatoide, e/ou de anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPA, do inglês *anti-citrullinated protein antibodies*) (Mota, Cruz, Brenola, *et al.*, 2013).

No entanto, reagentes de fase aguda de inflamação são pouco específicos para AR, e os anticorpos têm demonstrado menor sensibilidade e uma maior especificidade que esses reagentes. Além disso, o fator reumatoide e os ACPAs têm sensibilidade similar e há maior especificidade para os ACPAs (Nishimura *et al.*, 2007; Whiting *et al.*, 2010). Na prática clínica, os critérios de classificação de AR do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1987 ou os critérios do ACR e da Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) de 2010 têm sido utilizados como ferramentas para diagnosticar pacientes com AR (Arnett *et al.*, 1988; Aletaha *et al.*, 2010).

A busca por biomarcadores ideais de diagnóstico envolvem parâmetros que sejam mensurados e que possam ser obtidos de forma minimamente invasiva (do sangue, saliva ou urina) ou por imagem de tecidos e/ou órgãos acometidos. Desta forma, estratégias diagnósticas que incluam esses tipos de biomarcadores são mais atrativas e mais interessantes para serem estudadas (Burska *et al.*, 2014). Nesse contexto, é bem descrito na literatura que existem diversas citocinas que podem estar aumentadas no soro de pacientes com AR

quando comparadas a indivíduos sem a doença(Asquith e Mcinnes, 2007; Mcinnes e Schett, 2007).

Existem níveis significativamente maiores de IL-22 (Interleucina-22) no soro/plasma de pacientes com AR, comparados a controles saudáveis(Leipe *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2015). Estudo publicado em 2012 por nosso grupo corroborou essa assertiva e demonstrou que essa citocina está associada à atividade da doença mensurada por parâmetros denominados índices compostos de atividade de doença(Da Rocha, L. F. *et al.*, 2012). Outros estudos publicados demonstraram que células T produtoras dessa citocina (Th17 e Th22) são encontradas com maior frequência em células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes com AR, em comparação com indivíduos saudáveis(Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2017)

Estudos prévios evidenciaram que a interleucina-29 (IL-29) apresenta níveis séricos aumentados em soro de pacientes com AR, comparada a controles saudáveis(Wang *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2017). Embora com resultados controversos sobre sua associação com atividade de doença, a IL-29 está expressa em células da sinóvia de pacientes com AR, demonstrando ter papel importante na articulação de indivíduos doentes(Wang *et al.*, 2012).

Nesse âmbito, dosar níveis séricos destas citocinas em pacientes com AR e comparar com indivíduos sem a doença pode elucidar melhor a capacidade discriminativa dessas citocinas em identificar indivíduos doentes. Para isso, é necessário a avaliação de medidas de acurácia, que se referem ao grau de concordância de um determinado teste com uma referência padrão de diagnóstico. Desse modo, é possível determinar sensibilidade, especificidade e razões de verossimilhança (Florkowski, 2008).

Em face do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a habilidade das citocinas IL-29 e IL-22 em distinguir pacientes com AR em comparação com indivíduos com outras doenças reumatológicas e indivíduos saudáveis. Incluímos como controles doentes, pacientes com outras enfermidades reumatológicas que podem cursar com queixas articulares durante a história natural da doença e que, nesse contexto, contribuem para um cenário mais próximo da prática clínica. O teste utilizado foi a dosagem sérica da citocina e foi considerado como padrão os critérios de classificação de AR do ACR de 1987 e ACR/EULAR 2010 (Arnett, *et al.* 1988;Aletaha, *et al.*,

2010). Foi possível aferir medidas de acurácia e, de forma interessante, determinar pontos de corte ideais para distinguir pacientes com maior probabilidade de ter AR para cada citocina avaliada.

No decorrer do desenvolvimento desta tese foram elaborados 3 artigos, que se encontram nos resultados deste trabalho. O primeiro artigo é um artigo de revisão, que teve como objetivo reportar estudos de acurácia com novos biomarcadores na AR que foram publicados nos últimos 5 anos. O segundo e terceiro artigos avaliaram a acurácia das interleucinas 29 e 22 em diferenciar pacientes com AR de pacientes com outras doenças reumatológicas e de indivíduos saudáveis. O segundo artigo também demonstrou que níveis de IL-29 podem estar correlacionados com tempo de doença e idade. Em pacientes que têm o anticorpo fator reumatoide e a contagem absoluta de neutrófilos, também houve correlação com os níveis dessa citocina.

Os resultados encontrados neste trabalho chamam a atenção para o fato de dosagens séricas das citocinas IL-29 e IL-22, serem possíveis biomarcadores e capazes de distinguir pacientes com e sem a doença. A interpretação apropriada dos resultados encontrados depende primordialmente do padrão de referência utilizado como diagnóstico e das características dos pacientes estudados. As citocinas avaliadas foram analisadas em um grupo específico de pacientes. Estudos adicionais que avaliem medidas de acurácia dessas citocinas são necessários com desenhos e perfis de paciente diferentes para melhor elucidar o papel dessas proteínas na abordagem diagnóstica da AR.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Determinar a sensibilidade e especificidade das citocinas IL-22 e IL-29 no diagnóstico da Artrite Reumatoide.

1.1.2 Objetivos Específicos

I. Determinar níveis séricos das citocinas IL-22 e IL-29 nos soros de pacientes portadores de AR;

II. Determinar níveis séricos das citocinas IL-22 e IL-29 no soro de pacientes com outras doenças autoimunes como Lupus Eritematoso Sistêmico e Esclerose Sistêmica, assim como de pacientes com Osteoartrite, Fibromialgia e indivíduos saudáveis.

III. Correlacionar os níveis séricos dessas citocinas com os parâmetros clínicos de atividade da doença CDAI e DAS28, tanto quanto com a presença de erosões radiográficas, alterações laboratoriais e do autoanticorpo fator reumatoide;

IV. Determinar a sensibilidade e especificidade das dosagens das citocinas IL-22 e IL-29 na identificação de pacientes com artrite reumatoide, comparados a pacientes com outras doenças reumatológicas e controles saudáveis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARTRITE REUMATOIDE: CONCEITO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica autoimune inflamatória crônica de etiologia pouco conhecida e caracterizada por edema sinovial e inflamação articular. Caracteristicamente, a AR afeta punhos e pequenas articulações das mãos, podendo acometer a membrana sinovial de qualquer articulação diartrodial (McInnes e Schett, 2007). Além de suas manifestações articulares típicas, a AR pode cursar, menos frequentemente, com comprometimento extra-articular incluindo acometimentos cardíaco, pleuropulmonar, hematológico, neurológico, cutâneo e vascular, particularmente em pacientes com doença articular mais grave (Grassi *et al.*, 1998).

Apesar de se saber muito sobre seus aspectos genéticos e imunológicos, importantes na fisiopatogênese da doença, a AR ainda tem sua causa pouco conhecida. Atualmente sabe-se que alguns fatores estão associados ao desencadeamento da doença e à sua cronicidade (Smolen *et al.*, 2016). No entanto, a AR permanece em uma condição que leva a extrema incapacidade e perda de qualidade de vida (Rupp *et al.*, 2004; Radner *et al.*, 2011).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A incidência e prevalência da AR varia de acordo com diferentes estudos epidemiológicos em diversas partes do mundo. A maior parte dos estudos é de países europeus e dos Estados Unidos, estimando uma prevalência que varia de 0,2% a 1,1% (Alamanos e Drosos, 2005). No Brasil, estudo multicêntrico com amostras populacionais das macrorregiões do país – Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sul – encontrou prevalência de 0,2 até 1% da população adulta (Marques Neto *et al.*, 1993). Outro estudo, realizado em 2004 estimou uma prevalência de 0,46% no país (Senna *et al.*, 2004). A incidência anual da AR varia entre 20 a 50 casos por 100.000 habitantes em países norte-americanos e europeus (Alamanos *et al.*, 2006; Pedersen *et al.*, 2009).

A ocorrência da doença pode ser observada em todos os grupos étnicos (Alarcon, 1995), entretanto existem grupos específicos que têm incidência mais alta (Yamamoto *et al.*, 2015; Xu e Lin, 2017). A doença acomete mais mulheres que homens em uma proporção de 3-8 mulheres: 1 homem (Silman e Pearson, 2002; Cardiel, 2006). Apesar de ser considerada uma doença multifatorial, existe maior risco de desenvolver AR em parentes de pessoas com a doença, conferindo caráter hereditário (Kuo *et al.*, 2017). O início da doença é mais comum entre os 30 e os 50 anos de idade, embora possa acometer qualquer faixa etária (Carmona *et al.*, 2010; Hazes e Luime, 2011).

2.3 QUADRO CLÍNICO

As manifestações articulares da AR são oriundas do dano e da inflamação de estruturas articulares e periarticulares envolvidas. A doença tem curso insidioso e progressivo, na maioria das vezes. O quadro clínico característico é de dor e edema, com importante limitação dos movimentos, e pode ser antecedido por sintomas sistêmicos como astenia, fadiga, febre baixa e mal-estar. No entanto, esses sintomas podem apresentar-se concomitantemente ao quadro articular. O acometimento articular é caracteristicamente simétrico e acompanhado de edema e rigidez matinal prolongada – mais de 60 minutos (Smolen *et al.*, 2016). As articulações mais comumente afetadas são as articulações de punhos e pequenas articulações de mãos, tais como metacarpofalangeanas, interfalangeanas de polegares, interfalangeanas proximais e, particularmente no quadro inicial da doença, metatarsofalangeanas (FIGURA 1). Com a evolução da doença, pode haver acometimento de outras articulações como ombros, joelhos, tornozelos (FIGURA 2), as interfalangeanas proximais dos pés, as coxofemorais, a articulação atlantoaxial, temporomandibulares, esternoclaviculares e cristoaritenoides (Hochberg *et al.*, 2011). O quadro álgico articular da doença pode ser acompanhado de mialgia, fadiga, febre baixa, hiporexia e depressão (Carvalho *et al.*, 2014). A dor tem características inflamatórias (pior pela manhã e à noite com o repouso articular) e leva a importante incapacidade dos pacientes e a doença pode cursar com instabilidade articular e deformidades (Van Steenbergen *et al.*, 2017). As manifestações periarticulares

são oriundas da extensão do processo inflamatório para outras estruturas ou consequentes ao edema sinovial. São as tenossinovites, síndrome do túnel do carpo e tarso, rupturas tendinosas, bursites e cistos sinoviais (Rizzo *et al.*, 2013; Dequattro e Imboden, 2017).

Figura 1 - Sinovite de 2ª. e 3ª. metacarpofalangeanas e punho esquerdo em paciente com Artrite Reumatoide atendido no Ambulatório de Reumatologia do HC UFPE (reproduzido com a permissão do paciente).



Fonte: Rocha Jr, L.F. (2018).

Figura 2 - Sinovite de tornozelo esquerdo em paciente com Artrite Reumatoide atendido no Ambulatório de Reumatologia do HC UFPE (reproduzido com a permissão do paciente).



Fonte: Rocha Jr, L.F. (2018).

Apesar de menos frequentes, as manifestações extra-articulares incluem quadros cutâneos, oculares, pleuropulmonares, cardíacos, hematológicos, neurológicos. Essas são observadas em pacientes com doença grave e poliarticular, e que tem anticorpos presentes (fator reumatoide ou anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos). Os nódulos subcutâneos são as manifestações extra-articulares mais frequentes, ocorrendo em 20 a 40% dos pacientes (Chua-Aguilera *et al.*, 2017). As vasculites podem levar a ulceração cutânea, neuropatia periférica ou acometimento visceral. São menos comuns e relacionadas a AR grave e de longa evolução (Cojocar *et al.*, 2015). Pericardite e miocardite comumente não provocam sintomas aos pacientes, contudo, podem ser encontrado fusão ou espessamento do miocárdio em até 30% dos pacientes. As manifestações pulmonares compreendem a pleurite com ou sem derrame, nódulos pulmonares, fibrose intersticial e pneumonite. A fibrose intersticial é responsável por até 20% das mortes dos pacientes com AR (Da Mota *et al.*, 2011). Com relação às manifestações oftalmológicas, 10% dos pacientes podem apresentar certa conjuntivite seca que associada a um comprometimento inflamatório das glândulas salivares compõe a Síndrome de Sjogren (Vivino, 2017). Outras manifestações oculares incluem a esclerite, episclerite, ceratite, uveíte anterior e miosite orbitária (Tong *et al.*, 2014).

A doença cardiovascular (DCV) na AR ocorre mais precocemente que na população em geral. É considerada por alguns autores como manifestação extra-articular da doença (Gualtierotti *et al.*, 2017). Provavelmente a DCV está associada aos fatores de risco tradicionais e fatores não tradicionais como o estado de inflamação sistêmica persistente. Desta forma a AR é considerada um fator de risco independente para DCV. Adicionalmente, pacientes com AR tem risco 1,5 vezes maior de eventos cardiovasculares que a população geral (Solomon *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 2003; Solomon *et al.*, 2010).

2.4 FISIOPATOGENESE DA ARTRITE REUMATOIDE

A patogênese da AR é complexa e multifatorial com o envolvimento de fatores genéticos, hormonais e ambientais.

2.4.1 Fatores genéticos

O papel dos fatores genéticos tem sido amplamente reconhecido com a descoberta de um crescente número de *loci* e polimorfismos gênicos associados com a AR (Suzuki e Yamamoto, 2015). O alelo de risco mais importante para AR está no locus do complexo maior de histocompatibilidade II (MHC), sendo responsável por 30 a 40% da influência genética (Castro-Santos e Diaz-Pena, 2016). É reconhecida a contribuição do HLA para a susceptibilidade à AR, especificamente o alelo HLA-DR4 (McInnes e Schett, 2007), mas o mecanismo exato que determina a predisposição é desconhecido. Entre os genes do HLA, os alelos HLA-DRB1 com epítomos compartilhados que codificam uma sequência comum de aminoácidos (entre as posições 70-74 da terceira região supervariada) são o fator de risco mais importante descrito para a susceptibilidade e progressão (Castro-santos, 2016). Alguns aminoácidos ou moléculas variantes do HLA-DRB1 também foram associados a susceptibilidade para AR associada a anticorpos antiproteínas citrulinadas, doença mais severa, progressão do dano à radiografia assim como, a apresentação de autoantígeno citrulinado induzido pelo tabaco (Kim *et al.*, 2015; Van Steenbergem *et al.*, 2015). Alguns genótipos de HLA-E foram recentemente descritos por estarem associados a um risco reduzido de desenvolver a AR e a uma boa resposta aos agentes anti-fator de necrose tumoral (genótipo HLA-E 01:01/01:01), já o genótipo HLA-E 01:03 parece contribuir para uma menor probabilidade de atingir remissão da doença (Iwaszko *et al.*, 2015). O epítipo compartilhado também está associado à gravidade da doença, como manifestações articulares e progressão de erosões.

Houve um aumento significativo na descoberta da quantidade de genes associados à AR ultimamente. Além do locus HLA-DRB, mais de 46 loci de risco para AR não-HLA surgiram a partir de resultados de trabalhos e meta-análises do Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS, do inglês *genome-wide association study*). Desta forma, a variação genética pode ser explicada também por alelos de risco em *locus* não HLA (Stahl *et al.*, 2010; Eyre *et al.*, 2012). Outro estudo recente identificou 42 novos loci de risco para a AR e elevou o total para 101 (Okada *et al.*, 2014).

2.4.2 Fatores ambientais

Fatores ambientais como tabagismo e infecções também podem influenciar o desenvolvimento, a progressão e severidade da AR (Klareskog *et al.*, 2007; Getts e Miller, 2010). O tabagismo e outras formas de estresse em brônquios, como a exposição à sílica, aumentam o risco de desenvolvimento da doença entre pessoas com os alelos de susceptibilidade HLA-DRB1. O tabaco nesses indivíduos aumentou o risco de desenvolver ACPAs (Klareskog *et al.*, 2006). O tabagismo está possivelmente associado a modificações pós-translacionais, através da peptil arginina deaminase tipo IV (PAD4), que resulta em uma alteração quantitativa ou qualitativa na citrulinização de proteínas da mucosa. Essas proteínas citrulinadas, comportam-se como um “novo” aminoácido com quebra do mecanismo de tolerância imunológica e leva à formação destes autoanticorpos. Importante ressaltar que o processo de citrulinização pode ocorrer diferentes tipos de inflamação (McInnes e Schett, 2011).

Adicionalmente, agentes infecciosos como o vírus Epstein-Barr, citomegalovírus, as bactérias *Proteus mirabilis*, e *Escherichia coli* e seus produtos têm sido associados com AR. Embora com mecanismos ainda pouco elucidados, alguns autores postulam que o mimetismo molecular possa estar associado a esses fatores (Ebringer e Wilson, 2000; Sakkas *et al.*, 2017). A formação de imunocomplexos durante o processo infeccioso desencadeia a formação do fator reumatoide, um autoanticorpo de alta afinidade contra a porção Fc da imunoglobulina G. O envolvimento desse autoanticorpo na AR já é bem estabelecido, assim como seu envolvimento na patogênese da doença (Firestein, 2003; McInnes e Schett, 2007). Adicionalmente, a AR e formação de ACPA tem sido associada à doença periodontal, particularmente a periodontite associada à infecção pela bactéria *Porphyromonas gingivalis* (Wegner *et al.*, 2010). Bactérias da microbiota intestinal também influenciam o surgimento de autoimunidade em modelos animais de artrite e seu papel tem sido melhor estabelecido atualmente (Scherer e Burmester, 2011).

2.4.3 Fatores hormonais

O papel dos hormônios no desenvolvimento da AR ainda é controverso. De maneira geral, postula-se que estrógenos têm efeitos pró-inflamatórios e andrógenos têm efeito anti-inflamatório. Tal fato explicaria a maior incidência da doença em mulheres. (Alpizar-Rodriguez e Finckh, 2017). Entretanto, estrógenos podem ter efeitos estimulatório e inibitório na inflamação (Straub, 2007). Estudo prévio demonstrou que o sulfato de hidroepiandrosterona e a di-hidrotestosterona reprimem o promotor do gene da IL-6, diminuindo a expressão dessa citocina. Tal fato pode explicar um dos efeitos anti-inflamatórios dos andrógenos. O efeito inflamatório dos estrógenos consiste principalmente em modulação da proliferação celular e da produção de citocinas (i.e., TNF, IL-1, IL-12)(Cutolo *et al.*, 2006). Além disso, demonstrou-se que macrófagos expressam receptores para estrógenos e andrógenos, sendo capazes de convertê-los em seus metabólitos ativos (Cutolo *et al.*, 1996).

2.5 AUTOANTICORPOS NA ARTRITE REUMATOIDE

Autoanticorpos são encontrados no soro de pacientes com AR direcionados a diversos antígenos próprios como colágeno tipo II, catepsina, calreticulina, proteína de ligação da imunoglobulina BiP (do inglês, *bindingimmunoglobulinprotein*), glicoproteína 39, a parte Fc da IgG (fator reumatoide) e uma série de proteínas que sofreram modificações pós-traducionais nas quais a conversão de resíduos de arginina em citrulina torna a proteína antigênica (ACPA) (Scherer e Burmester, 2011).

Na AR, os autoanticorpos com importante valor diagnóstico, prognóstico e que têm sido mais bem descritos são o fator reumatoide (FR) e o ACPA. O fator reumatoide foi o primeiro anticorpo identificado na AR e é dirigido contra a porção Fc da IgG. O papel fisiológico do FR é auxiliar no clareamento de imunocomplexos circulantes. Pode ser patogênico através da geração de imunocomplexos e causando inflamação em sítios onde o seu receptor FcγRIIIa é expresso (na sinóvia, superfícies serosas, e sítios onde há formação de nódulos reumatoides) (Vogelpoel *et al.*, 2015), aumentando a permeabilidade vascular e a liberação de fatores quimiotáticos relacionados ao recrutamento de células efectoras imunocompetentes (Scherer e Burmester,

2011). O FR-IgM pode ser detectado em 60 a 80% dos pacientes com AR e doença estabelecida. Contribui para atividade e cronicidade da doença através das vias mediadas por complemento. O FR pode ser positivo em pessoas sem artrites ou em outras doenças (Da Mota *et al.*, 2012). Pacientes com positividade para o FR e que apresentem esse anticorpo em altos títulos sofrem de doença mais grave e destrutiva quando comparados a pacientes com a ausência deste anticorpo, estando também relacionado às manifestações extra-articulares (Turesson *et al.*, 2007).

Os ACPAs são altamente específicos para AR e também são expressos na sinóvia. Os ACPAs têm sido bastante discutidos recentemente e têm envolvimento potencial na patogênese da doença. Antígenos citrulinados estão presente na sinóvia inflamada e nos centros germinativos secundários no tecido sinovial e títulos aumentados de ACPA no líquido sinovial sugerem produção local destes anticorpos na articulação acometida pela AR (Kinloch *et al.*, 2008). Os ACPAs são uma coleção policlonal de anticorpos que reconhecem diferentes epítomos citrulinados. O ensaio laboratorial para detecção de ACPA mais utilizado é o anti-CCP. Várias proteínas próprias citrulinadas são detectadas no anti-CCP: α -enolase, fibrinogênio, fibronectina, queratina e colágeno. Anticorpos que reconhecem essas proteínas têm sido encontrados em modelos experimentais de artrite (Uysal *et al.*, 2009).

Outro grupo de anticorpos tem sido descrito recentemente na AR. À semelhança da resposta contra peptídeos citrulinados, existe um sistema de autoanticorpo direcionado a um determinante estrutural similar. Estes anticorpos reconhecem proteínas carbamiladas e, portanto, são chamados anticorpos antiproteínas carbamiladas (anti-CarP). A carbamilação consiste na modificação pós-traducional de resíduos de lisina a homocitrulina, causa do reconhecimento pelos anticorpos anti-CarP. Há uma estimativa de que 16% a 30% dos pacientes anti-CCP negativos são anti-CarP positivos (Trouw *et al.*, 2013).

2.6 INFLAMAÇÃO NA ARTRITE REUMATOIDE

O edema articular observado nos pacientes com AR reflete inflamação na membrana sinovial consequente da ativação do sistema imune. É

caracterizado pela infiltração de leucócitos dentro do compartimento sinovial que normalmente é composto por poucas células. A sinovite na AR é composta por células que incluem células da imunidade inata (por exemplo, monócitos, células dendríticas, mastócitos, e células linfoides) e células da imunidade adaptativa (por exemplo, linfócitos T helper-1, linfócitos T helper 17, células B, plasmoblastos, e plasmócitos) (McInnes e Schett, 2007). A destruição articular na AR é promovida por uma resposta tecidual bastante exacerbada na qual fibroblastos sinoviais tornam-se células inflamatórias agressivas, reguladoras de matriz e com um fenótipo invasivo que agem conjuntamente com um catabolismo articular aumentado e um fenômeno chamado osteoclastogênese (Walsh e Choi, 2014).

O meio inflamatório no compartimento sinovial é regulado por uma rede complexa de citocinas e quimiocinas. Citocinas e quimiocinas levam a indução ou agravamento da resposta imune através da ativação de células endoteliais e atração de células do sistema imune, de forma que se acumulam dentro do compartimento sinovial. Fibroblastos sinoviais são ativados conjuntamente com células T e B, monócitos e macrófagos (Alam *et al.*, 2017). Há a ativação de osteoclastos via ligante do receptor ativador de fator nuclear κ B (RANKL). O RANKL é expresso em células T, células B e fibroblastos e seu receptor (RANK) é expresso em macrófagos, células dendríticas e pré-osteoclastos (Corrado *et al.*, 2017). Essas alterações estão associadas ao aparecimento de erosões ósseas justacondrais. A cartilagem sofre danos devido aos efeitos catabólicos em condrócitos após seu estímulo pelas citocinas. A matriz de cartilagem é degradada por metaloproteinases de matriz e outras enzimas (Denarie *et al.*, 2014). Citocinas ligam-se a receptores específicos para desencadear vários eventos de sinalização intracelular levando à ativação de genes que induzem ou agravam inflamação e o dano articular (McInnes e Schett, 2007).

Várias citocinas têm demonstrado participar da fisiopatogênese da artrite reumatoide. O IFN γ tem sido demonstrado estar associado à produção de citocinas por macrófagos e síntese de colágeno e liberação de citocinas por fibroblastos sinoviais, entretanto níveis de IFN γ na sinóvia são baixos o que torna a importância de sua participação na inflamação na AR ainda controversa (Okamoto, 2008).

Uma população de células T efetoras, que está associada à produção de interleucina-17, tem demonstrado importante papel na AR. A IL-17 está relacionada à diferenciação de neutrófilos e maturação, liberação e ativação de outras citocinas, ativação de monócitos, ativação de fibroblastos sinoviais e liberação de quimiocinas, produção de citocinas e síntese de metaloproteinases de matriz (Sato, 2008). A IL-17 também induz a expressão de outras citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF (Bettelli *et al.*, 2008). Há ativação de células dendríticas na articulação com a participação do fator de necrose tumoral (TNF). Baixas concentrações de IL-17, IL-1 β e TNF, podem levar a produção e ativação de citocinas e de fibroblastos sinoviais (McInnes, 2011).

O TNF- α desempenha um papel fundamental através da ativação da expressão de outras citocinas e quimiocinas, expressão de moléculas de adesão de células endoteliais, promoção de angiogênese, supressão de células T regulatórias e indução de dor (McInnes e Schett, 2007; 2011). De importância similar, a interleucina-6 atua na ativação local de leucócitos e produção de autoanticorpos e está associada a efeitos sistêmicos que promovem respostas dos reagentes de fase aguda, anemia, disfunção cognitiva e disfunção na regulação do metabolismo lipídico (McInnes e Schett, 2011; Smolen *et al.*, 2016).

Outras citocinas têm demonstrado papel importante e têm sido estudadas como possíveis alvos terapêuticos, como biomarcadores e/ou para melhor compreensão da fisiopatogênese de uma doença bastante complexa como a AR (Siebert *et al.*, 2015), dentre elas destacam-se duas citocinas descritas com maior atenção em estudos sobre a AR: a IL-22 e a IL-29.

2.6.1 A interleucina 29

A interleucina-29(IL-29) pertence a um grupo de citocinas conhecidas como Interferon (IFN).Os IFNs são descritos em três tipos (tipo I, tipo II e tipo III) e têm conhecida função antiviral, antiproliferativa, antitumoral e imunorregulatória. Apesar de a atividade antiviral ter sido a mais explorada em estudos divulgados nos últimos anos, o papel imunorregulador permanece

pouco compreendido. A família dos IFNs tipo III, também conhecida como IFN- λ , trata-se de uma descoberta recente e tem três membros: IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) e IFN- λ 3 (IL-28B). Cada um deles exerce a função de sinalizar para um complexo receptor heterodímico, que, por sua vez, possui duas subunidades: IFN- λ R1 (IL-28R α , LICR ou CRF2-12) e receptor tipo 2 da IL-10 (IL-10R β , IL-10R2) (Witte *et al.*, 2010; Kotenko, 2011; Chang *et al.*, 2017).

A IL-29 é tida como a mais ativa entre todas os IFN- λ s III. Além de ter conhecida ação sobre a patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (LES), estudos mostram que a IFN- λ 1 é expressa em níveis séricos significativamente maiores nos pacientes com AR quando esses são postos em comparação com pacientes controles saudáveis (Wu *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Xu, D. *et al.*, 2015). Em parte, a atividade da IL-29 está ligada a expressão e distribuição de seu receptor específico IL-28R α , já que várias células são capazes de expressá-lo – inclusive fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e células da via Th17 (Wang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Há estudos que mostram também que a expressão das IFN- λ s é induzida a partir de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs), quando estimuladas com poli (I:C) ou lipopolisacarídeo (LPS) e/ou por infecção viral (Dumoutier *et al.*, 2004; Ouyang *et al.*, 2011).

A evidência do potencial de regulação imune da família IFN- λ é apoiada pelo conhecimento de que seus receptores são expressos de forma mais limitada quando comparados, por exemplo, aos complexos receptores das IFN α , um resultado sugestivo de que elas atuam mais especificamente na ativação de respostas do sistema imune (De Groen *et al.*, 2014). Ainda que as pesquisas sobre a resposta imunorreguladora desse grupo de citocinas permaneçam pouco exploradas, descobertas recentes demonstram que a IL-29 tem parte nas causas de inflamação da membrana sinovial em pacientes com AR (Wang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Diante disso, sabe-se agora que a atividade da IL-29 envolve a produção de outras citocinas que, por sua vez, recrutam células diretamente envolvidas nos sítios de inflamação, sendo macrófagos e fibroblastos a principal fonte celular para a expressão da IL-29 na sinóvia. A essa capacidade de estimular a expressão de diferentes grupos de citocinas atribui-se a indicação de que a IFN- λ 1 participa de outras vias patogênicas além da inflamatória, já que elas participam de respostas tanto do

sistema imune inato quanto do adaptativo (Wang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Xu, L. *et al.*, 2015).

Estudos que têm ajudado a esclarecer as vias de imunorregulação da IL-29, constataram que ela é responsável pelo controle da produção por monócitos de IL-6, IL-8 e IL-10, citocinas inflamatórias com conhecidas papéis de resposta imune (Jordan, Eskdale, Boniotto, *et al.*, 2007; Jordan, Eskdale, Srinivas, *et al.*, 2007). Testes *in vitro* demonstraram que a IFN- λ 1 estimula macrófagos de linhagem RAW264.7 a expressarem receptores do tipo Toll-like (TLR). Os TLRs, por sua vez, possuem ligantes que induzem a expressão de citocinas (tais como IL-1 β , IL-6 e IFN- α), IL-8 (uma quimiocina) e metaloproteinases de matrix (MMP) em fibroblastos sinoviais (Pierer *et al.*, 2004; Noss e Brenner, 2008). As MMPs são enzimas que regulam a composição da matriz celular e possuem papel chave na destruição articular (Kazantseva *et al.*, 2013). Outros trabalhos explicam que a IL-9 atua, ainda, como indutora da proliferação dependente de IL-2 de um subconjunto de células T CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) em células dendríticas, apresentadoras de antígenos (Mennechet e Uze, 2006), inibidora via Th2 e modulara das vias Th1/Th2 (Jordan, Eskdale, Srinivas, *et al.*, 2007; Srinivas *et al.*, 2008).

Embora expressa em PBMCs e na membrana sinovial de pacientes com AR em níveis significativamente mais altos, quando comparando-os com indivíduos saudáveis, a IL-29 não se correlaciona com provas de atividade de doença e de diagnóstico (DAS28, PCR, VSH, anti-CCP e Fator Reumatóide) (Wang *et al.*, 2012; Xu, L. *et al.*, 2015). O tratamento com drogas modificadoras de doença são eficazes no declínio dos níveis séricos de IL-29, principalmente daqueles pacientes que apresentam anti-CCP positivo (Chang *et al.*, 2017).

2.6.2 A interleucina 22

A interleucina (IL) 22 é membro da superfamília da IL-10 (Dumoutier *et al.*, 2000). O sinal de transdução da IL-22 é mediado por um complexo de receptores constituído por um receptor de IL-22 específico (tipo 1) – IL-22R1 e as subunidades comuns ao receptor de IL-10 (tipo 2) – IL-10R2 (Kotenko *et al.*,

2001; Renauld, 2003). É produzida por variadas fontes de células incluindo células Th17, células Th 22, células NK, células indutoras de tecido linfóide e células T $\gamma\delta$ (Xie *et al.*, 2015). A IL-22 tem um papel importante na defesa de patógenos, cicatrização de feridas e reorganização tecidual. A produção de IL-22 por células do sistema imune inato é essencial para a imunidade protetora contra patógenos extra-celulares como *Klebsiellapneumoniae* no pulmão e *Citrobacterrodentium* no intestino (Aujla *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008). O papel protetor da IL-22 na imunidade inata é independente da imunidade adaptativa (Shabgah *et al.*, 2017). Também tem papel muito importante na resposta imune adaptativa através da ativação de células T CD4 e na resposta inata pela ativação de linfócitos como as células NK (*natural killer*) (Zenewicz e Flavell, 2011). A interleucina 22 participa da regeneração de células epiteliais no intestino através da indução e inibição da apoptose, esta função tem efeitos positivos na função de barreira do epitélio intestinal (Lindemans *et al.*, 2015). A indução de reagentes da fase aguda como proteína amiloide sérica, proteína ligante de LPS, haptoglobina e alfa-1 antiqumiotripsina nas células hepáticas e modulação de respostas teciduais durante a inflamação (Aggarwal *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2010).

Com relação às doenças autoimunes existem descrições que corroboram o envolvimento da IL-22 na patogênese de diversas doenças como doenças neurológicas (síndrome de GuillainBarré, esclerose múltipla), lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren e doença de Crohn (Xin, 2015). Estudos prévios sugerem que a expressão da IL-22 é anormal em modelos murinos de artrite e em pacientes com AR, sugerindo importante papel desta citocina na fisiopatogênese da doença.

Na artrite induzida por colágeno (CIA, do inglês *collageninducedarthritis*), esplenócitos de camundongos com artrite inicial estimulados com colágeno e IL-22 levou a um aumento significativo na produção de IL-17 (Sarkar *et al.*, 2013). Adicionalmente, outro estudo demonstrou que esplenócitos de camundongos com CIA que receberam anticorpos anti-IL-22 e estimulados com colágeno tinham expressão aumentada de IFN-gamma (Justa *et al.*, 2014). Estes achados sugerem importante papel da IL-22 na fisiopatogênese da AR, tanto na via Th1, quanto no fenótipo Th17. Camundongos deficientes em IL-22 ("knockout" IL-22^{-/-}) quando induzidos a terem artrite demonstraram

níveis significativamente do escore de artrite, e a reduzida severidade da artrite foi associada a uma marcada menor formação de *pannus* (Geboes *et al.*, 2009).

Por outro lado, há estudos que demonstraram que camundongos que receberam anticorpo anti-IL-22 antes do início da artrite induzida tiveram maior incidência e severidade da artrite. A análise histopatológica da pata destes camundongos encontrou maiores escores de inflamação sinovite, destruição de cartilagem e envolvimento ósseo (Sarkar *et al.*, 2013; Justa *et al.*, 2014). Sugere-se que IL-22 tenha papel dual na artrite, protetora antes do início da artrite e patogênica após seu desenvolvimento (Xie *et al.*, 2015).

Níveis séricos de IL-22 estão significativamente aumentados no soro/plasma de pacientes com AR comparados com controles (Leipe *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Da Rocha, L. F. *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013; Leipe *et al.*, 2014). Além disso, há descrição de frequência elevada de células T IL-22+CD4⁺ (fenótipos Th17 e Th22) em PBMCs de pacientes com AR comparados com controles. (Shen *et al.*, 2009; Leipe *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013).

Adicionalmente, níveis séricos de IL-22 e células T IL-22+CD4⁺ estão positivamente correlacionados com parâmetros clínicos de atividade de doença como os índices de atividade DAS28 e CDAI e níveis de proteína C reativa (PCR) (Zhang *et al.*, 2011; Da Rocha, L. F. *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Níveis mais altos de IL-22 foram associados com a presença do fator reumatoide (FR) e com erosões radiográficas em um trabalho publicado por nosso grupo (Da Rocha, L. F., Jr. *et al.*, 2012). O líquido sinovial (LS) de pacientes com AR apresentou concentrações aumentadas de IL-22 quando comparado ao líquido sinovial de pacientes com osteoartrite em estudos anteriores. Também houve correlação da IL-22 no LS com níveis séricos de FR e anti-CCP (Ikeuchi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012). O receptor solúvel do ligante do ativador do fator nuclear-kB (sRANKL) e IL-25 também foram reportados como estarem correlacionando-se positivamente com as concentrações de IL-22 no LS (Kim *et al.*, 2012). Adicionalmente, níveis altos de IL-22 foram encontradas nas camadas internas do tecido sinovial marcadas com CD68 (marcador de macrófagos) e vimentina (marcador de

fibroblastos sinoviais), indicando que a maior parte das células IL22+ na sinóvia eram macrófagos e fibroblastos (Ikeuchi *et al.*, 2005). Em articulações de modelos de artrite branda de camundongos (IL-1Ra_{-/-}) a IL-22 teve baixa expressão, porém sua expressão estava significativamente aumentada em camundongos com artrite severa (Marijnissen *et al.*, 2011). Outros modelos de artrite em camundongo também mostraram expressão aumentadas no tecido sinovial e em esplenócitos durante a fase inicial da artrite (Sarkar *et al.*, 2013).

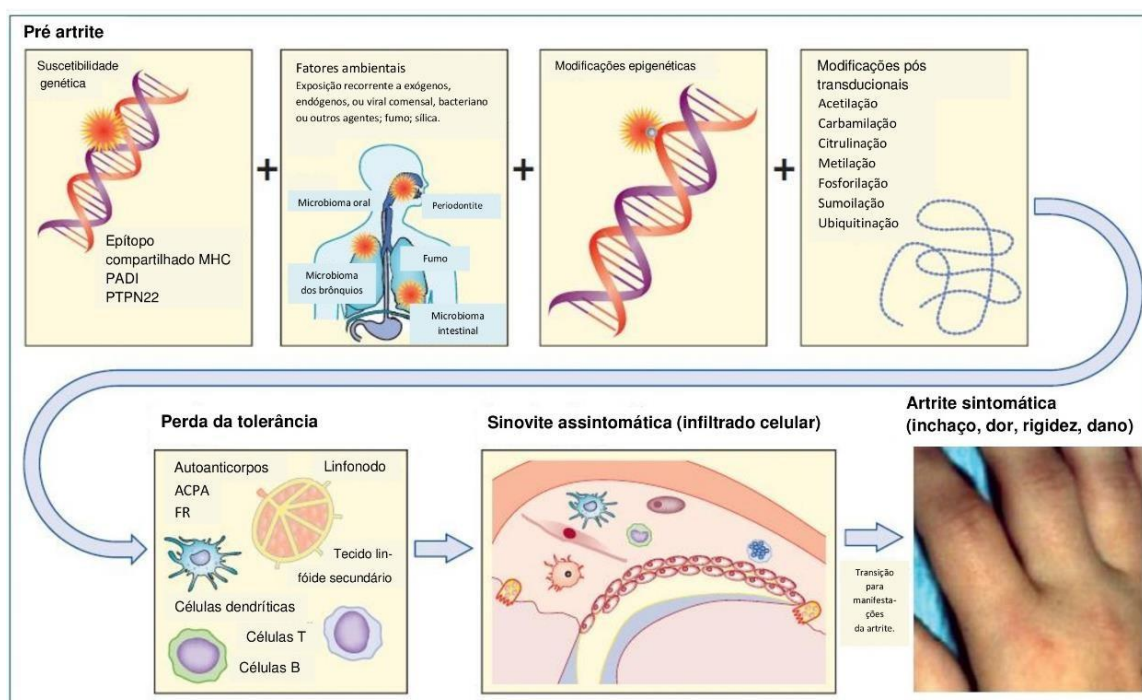
Um estudo demonstrou que o estímulo de fibroblastos sinoviais com IL-22 humana recombinante (rhIL-22) induziu a expressão aumentada do mRNA do RANKL e de sua proteína (Kim *et al.*, 2012). Este mesmo estudo também reportou que fibroblastos sinoviais pré-incubados na presença de diferentes inibidores de sinais e estimulados com rhIL-22 tinha expressão diminuída do RANKL (Kim *et al.*, 2012). Tais achados que associam a IL-22 ao RANKL, demonstram que essa citocina tem importante associação com a osteoclastogênese característica da fisiopatogênese da AR.

Fibroblastos sinoviais tratados com rhIL-22 tiveram sua proliferação significativamente aumentada, sugerindo que esta citocina pode contribuir para a hiperplasia sinovial característica da AR. Também há expressão significativamente aumentada de proteína 1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein 1* e de metaloproteinase de matriz 1 (MMP, do inglês *matrix metalloproteinase*) (Ikeuchi *et al.*, 2005; Carrion *et al.*, 2013).

2.6.3 Fases clínicas da artrite reumatoide

Para melhor entendimento da fisiopatogênese e sua associação com o quadro clínico, a AR costuma ser dividida por alguns autores em diferentes fases em indivíduos com risco de desenvolver a doença (FIGURA 3).

Figura 3 - Evolução da Artrite Reumatoide



Fonte: Smolen *et al.* (2016), traduzida para o português.

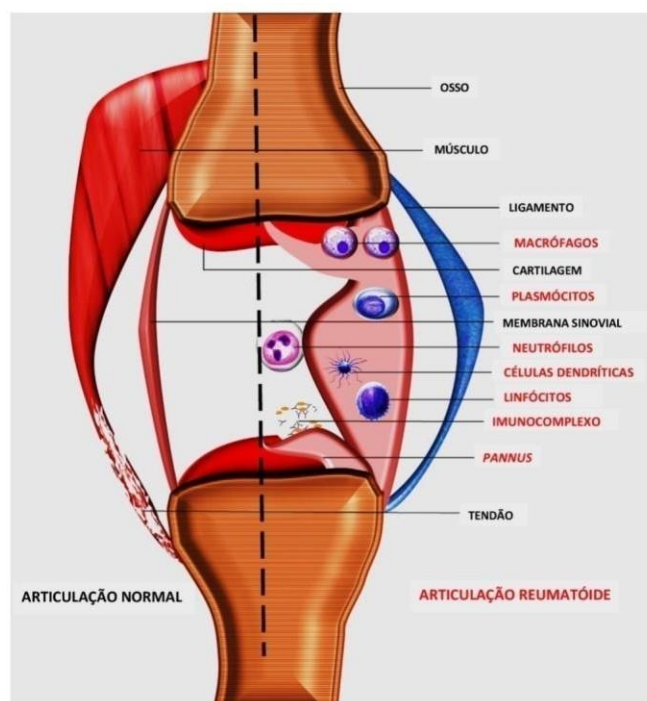
A fase pré-clínica envolve a interação entre os fatores genéticos e os fatores ambientais associados ao risco de desenvolver a doença, seguido da produção de autoanticorpos como o FR e os ACPAs. Existe, em seguida, uma fase de transição até a fase clínica que é marcada pela saturação de todos os fatores acima mencionados e perda de tolerância imunológica no organismo. Essa fase pode ser desencadeada por pequenos traumas, infecções, hormônios e fatores psicológicos (Smolen *et al.*, 2016; Alam *et al.*, 2017; Firestein e McInnes, 2017; Paul *et al.*, 2017).

A fase clínica, oriunda da ativação da imunidade inata e adaptativa, é caracterizada pela infiltração de leucócitos no compartimento sinovial com reorganização da arquitetura da sinóvia e ativação de fibroblastos localmente, ativação de células endoteliais nos microvasos da sinóvia, pela expressão de moléculas de adesão como integrinas, selectinas e quimiocinas. A hipóxia local e a produção de citocinas levam à neoangiogênese. No início dessa fase, clinicamente os pacientes desenvolvem artralgia ou rigidez matinal, no entanto, não há evidência clínica de artrite. Por conseguinte, os pacientes desenvolvem artrite em uma ou duas articulações, podendo ser denominada, em algumas situações, de artrite indiferenciada inicial. Em alguns casos, a artrite pode ser

intermitente e chamada de reumatismo palindrômico. Em uma fase posterior, os pacientes desenvolvem artrite reumatoide estabelecida. Com a evolução desta fase para a cronicidade, a membrana sinovial torna-se hiperplasiada formando um tecido que recobre a cartilagem e o osso subcondral que é chamado de *pannus*. O *pannus* é um tecido invasivo formado por estruturas celulares que produzem enzimas associadas a destruição de cartilagem e osso e, além disso, apresenta intensa formação vascular, angiogênese e centros germinativos secundários, compostos por macrófagos, células plasmáticas, células dendríticas, linfócitos e imunocomplexos, tornando-se estruturas linfoides distintas. A FIGURA 4 demonstra uma articulação com sinovite comparada a uma articulação normal (Smolen *et al.*, 2016; Alam *et al.*, 2017; Firestein e McInnes, 2017; Paul *et al.*, 2017).

O termo pré-artrite reumatoide é usado para identificar eventos que estão presentes antes do início da doença clinicamente. Esse período é caracterizado pela presença de anormalidades na função e respostas do sistema imune, porém sem evidências clínicas de dano tecidual. De forma importante, nem todos pacientes experimentam todos os estágios aqui descritos e as fases podem ser superpostas (Smolen *et al.*, 2016; Alam *et al.*, 2017; Firestein e McInnes, 2017; Paul *et al.*, 2017).

Figura 4 - Sinovite na artrite reumatoide



Fonte: Alam *et al.* (2017), traduzida para o português.

2.7 DIAGNÓSTICO DA ARTRITE REUMATOIDE

O diagnóstico da AR é estabelecido considerando-se achados clínicos e exames complementares (Da Mota *et al.*, 2011; Mota, Cruz, Brenola, *et al.*, 2013). Apesar de desenvolvidos com a finalidade de classificação de doença, os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1987 para AR (Arnett *et al.*, 1988) são frequentemente utilizados como auxiliares no diagnóstico e como base para os critérios de inclusão em muitos estudos de intervenção terapêutica (Tabela 1)(Mota, Cruz, Brenol, *et al.*, 2013). Entretanto, esses critérios têm melhor desempenho em pacientes com doença de longa evolução e são considerados menos adequados na identificação de indivíduos com AR em sua fase inicial. Diante disso e da descoberta dos anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPAs), o ACR e a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) elaboraram novos critérios de classificação (Tabela 2) (Aletaha *et al.*, 2010). Atualmente, não há recomendação para substituir os critérios de 1987 pelos de 2010, podendo-se utilizar ambos para fins de classificação e, eventualmente, para o estabelecimento de diagnóstico clínico (Da Mota *et al.*, 2011; Mota, Cruz, Brenola, *et al.*, 2013).

O exame laboratorial mais utilizado na prática clínica para diagnóstico da artrite reumatoide é a detecção do Fator Reumatoide, anticorpo contra a porção FC da imunoglobulina G (Dorner *et al.*, 2004). No entanto, o fator reumatoide pode estar presente em outras doenças autoimunes, como Lupus eritematoso sistêmico, doença mista do tecido conjuntivo e Síndrome de Sjogren, e também em outras condições, como doenças infecciosas crônicas e em pessoas com idade mais avançada (Song e Kang, 2010). Outros exames laboratoriais utilizados no diagnóstico são as dosagens de proteína C reativa (PCR) e da velocidade de sedimentação das hemácias (VSH) que são indicadores de inflamação e desta forma, não são específicos para AR(Wolfe, 1997). Os anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPAs) tem melhor acurácia diagnóstica, porém, estão presentes em 70-90% dos pacientes com AR(Suzuki *et al.*, 2003).

Outras abordagens diagnósticas alternativas incluem perfil de genes específicos relacionados a AR. O perfil genético de fatores autoimunes também está associado à potencial relevância do genótipo HLA classe II, que pode

estar relacionado à progressão da AR. Na verdade, mais de 80% dos pacientes com AR carregam o epítipo HLA-DRB1*04 (Ronningen *et al.*, 1990).

Tabela 1 - Critérios do Colégio Americano de Reumatologia 1987 para classificação da Artrite Reumatoide. Para a classificação como Artrite Reumatóide, o paciente deve satisfazer a pelo menos 4 dos 7 critérios. Os critérios 1 até o 4 devem estar presentes por, no mínimo, 6 semanas. Adaptado de Da Mota *et al.* (2011) e Arnett *et al.* (1988).

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

Fonte: Adaptado de Da Mota *et al.* (2011) e Arnett *et al.* (1988)

Tabela 2 - Critérios classificatórios para AR 2012 ACR/ EULAR. Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR. FR: fator reumatoide; ACPA: anticorpos antiproteínas e antipeptídeos citrulinados; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação.

População-alvo (quem deve ser testado?)	
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).*	
Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença.	
*Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.	
Acometimento articular (0-5)	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3
>10 articulações (pelo menos uma pequena)	5
Sorologia (0-3)	
FR negativo E ACPA negativo	0
FR positivo OU ACPA positivo em baixos títulos	2
FR positivo OU ACPA positivo em altos títulos	3
Duração dos sintomas (0-1)	
<6 semanas	0
≥6 semanas	1
Provas de atividade inflamatória (0-1)	
PCR normal e VHS normal	0
PCR anormal OU VHS anormal	1

Fonte: Adaptado de Da Mota *et al.* (2011) e Aletaha *et al.* (2010).

2.8 ACURÁCIA DOS ANTICORPOS FATOR REUMATOIDE E ANTI-CCP NA ARTRITE REUMATOIDE

2.8.1 Medidas de acurácia

Estudos de acurácia referem-se a concordância entre um teste proposto (índice) e uma referência padrão na habilidade de identificar uma condição alvo. Acurácia diagnóstica é o grau de concordância entre o teste índice e o padrão de referência. O ponto inicial para a avaliação é a construção de uma tabela 2x2 com o teste índice em um lado e o teste de referência no outro (Tabela 3)(Cohen *et al.*, 2006; Florkowski, 2008).

Sensibilidade (“positividade em doentes”) refere-se à proporção de indivíduos que tem a condição alvo (positivos para o padrão de referência) e tem resultados positivos para o teste que está sendo avaliado (índice). Especificidade (“negatividade em saudáveis”) é a proporção de indivíduos sem a condição alvo que tem resultados negativos para o teste índice (Florkowski, 2008; Cohen *et al.*, 2016).

Valor preditivo positivo é a proporção de resultados positivos que são verdadeiros positivos, enquanto valor preditivo negativo é a proporção de resultados negativos que são verdadeiros negativos. Valores preditivos variam, dependendo da prevalência da condição alvo na população estudada (Florkowski, 2008; Cohen *et al.*, 2016).

A abordagem para avaliação de acurácia, geralmente, requer a criação de um ponto de corte (*cut off*) de um dado contínuo e dependendo do ponto de corte escolhido, a sensibilidade e especificidade de um teste irá variar. Curvas ROC (do inglês, *receiver-operating characteristic*) são uma maneira de representar graficamente verdadeiros positivos *versus* falsos positivos, dentro de uma amplitude de pontos de corte, e de selecionar o ponto de corte ótimo para prática clínica (Florkowski, 2008; Cohen *et al.*, 2016).

As razões de verossimilhança são uma forma de descrever o desempenho de um teste diagnóstico. Elas resumem o mesmo tipo de informação que a sensibilidade/especificidade, e podem ser usadas para calcular a probabilidade de doença depois de um teste positivo ou negativo. Podem ser representadas em negativas ou positivas. A razão de

verossimilhança positiva refere-se à probabilidade de se ter a condição alvo se o teste for positivo. A razão de verossimilhança negativa indica a probabilidade de não ter a condição alvo caso o teste seja positivo (Florkowski, 2008; Cohen *et al.*, 2016).

Tabela 3 - Representação esquemática de medidas de acurácia.

Referência padrão			
	Doentes	Não-doentes	Total
Teste índice positivo	Verdadeiros positivos (VP)	Falsos positivos (FP)	VP + FP
Teste índice negativo	Falsos negativos (FN)	Verdadeiros negativos (VN)	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	

Fonte: Florkowsk (2008).

Com base na tabela acima é possível identificar aos seguintes parâmetros associados à acurácia de um teste:

$$\text{SENSIBILIDADE} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

$$\text{ESPECIFICIDADE} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

$$\text{VALOR PREDITIVO POSITIVO} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FP})$$

$$\text{VALOR PREDITIVO NEGATIVO} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FN})$$

$$\text{RAZÃO DE VEROSSIMILHANÇA POSITIVA} = \text{SENSIBILIDADE} / (1 - \text{ESPECIFICIDADE})$$

$$\text{RAZÃO DE VEROSSIMILHANÇA NEGATIVA} = (1 - \text{SENSIBILIDADE}) / \text{ESPECIFICIDADE}$$

$$\text{ACURÁCIA} = (\text{VP} + \text{VN}) / \text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}$$

2.8.2 O Fator reumatoide e Anti-Ccp

Um importante trabalho de metanálise, realizado em 2007, examinou 37 estudos com 14.949 pacientes que avaliaram a acurácia do anti-CCP e 50 estudos com 15.286 pacientes que avaliaram o Fator reumatoide. A sensibilidade e especificidade do anti-CCP foi de 67% (IC, 65% a 68%) e 95% (CI, 95 a 96%), respectivamente. Para o Fator Reumatoide (IgM) a

sensibilidade foi de 69% (CI, 68% a 70%) e especificidade foi de 85% (CI, 84 a 86%) (Nishimura *et al.*, 2007). Os autores reportam nesse estudo que dados de estudos que foram limitados a pacientes com artrite reumatoide inicial (duração dos sintomas menor que um ano) foram similares quando comparados a todos os estudos avaliados. Como as sensibilidades estimadas foram similares para o anti-CCP e para o FR, a melhor acurácia diagnóstica do anticorpo anti-CCP foi devida, principalmente, à sua especificidade mais alta. Os estudos que avaliaram a acurácia diagnóstica da positividade para o anti-CCP e Fator Reumatoide IgM juntos não demonstraram uma melhora acurácia que a positividade para o anti-CCP isolada. Alguns estudos têm resultados conflitantes quando tentam comparar a performance do Fator Reumatoide IgG e IgA com o Fator reumatoide IgM (Banchuin *et al.*, 1992; Van Leeuwen *et al.*, 1995; Swedler *et al.*, 1997).

Uma revisão sistemática realizada em 2010 com metanálises de 151 estudos avaliou as características de desempenho dos anticorpos antipeptídeos citrulinados (ACPA). Nesse estudo a sensibilidade do ACPA foi de 67% e a especificidade foi de 96%. Houve bastante heterogeneidade nos testes avaliados, que resultaram de diferenças no desenho dos estudos, estágios da doença avaliados, e tipo de ACPA utilizado em cada estudo. Estudos transversais e casos-controle de pacientes com AR estabelecida superestimaram a sensibilidade do ACPA. Nos estudos de coorte de pacientes com AR por menos de 2 anos, a sensibilidade do anti-CCP2 e do fator reumatoide foram bastante próximas (58 vs. 56%), mas a especificidade foi significativamente maior para o anti-CCP2 (96 vs. 86%). Entretanto, não houve evidência suficiente para determinar se a combinação do anti-CCP2 com fator reumatoide oferece um melhor benefício do que usar apenas o anti-CCP2 (Whiting *et al.*, 2010). Esse estudo identificou apenas 4 outros estudos com dados suficientes para avaliar se o anti-CCP2 teria potencial em identificar pacientes com artrite reumatoide muito inicial.

Um estudo realizado em 2008, avaliou a influência do anti-CCP2 nos critérios do ACR de 1987. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 39%. A inclusão do anti-CCP2 como critério adicional aumentou a sensibilidade de 51% para 55%, com pouca mudança na especificidade. Quando o critério nódulo reumatoide foi substituído pelo anti-CCP2, a sensibilidade aumentou

para 77% mas a especificidade diminuiu de 91 para 79%. Ao retirar nódulos reumatoides e alterações radiográficas dos critérios a sensibilidade de 51% foi para 74% e houve perda da especificidade de 91% para 81%(Liao *et al.*, 2008).

Sun e colaboradores, em uma metanálise recente, analisaram 24 estudos que evidenciaram a acurácia diagnóstica do fator reumatoide combinada ao anti-CCP (Sun *et al.*, 2014). Quando ambos foram positivos, os autores avaliaram que os estudos mostraram excelentes especificidades, que variaram moderadamente. A especificidade estimada foi de 96% variando de 89% para 100%. Por outro lado, a sensibilidade estimada foi classificada como baixa e variável em diversos trabalhos. A sensibilidade estimada foi de 57% com uma variação de 33% a 80%, apresentando bastante heterogeneidade. A área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*) calculada para a combinação desses dois anticorpos foi de 0.90. No mesmo estudo, os autores compararam a sensibilidade da combinação dos anticorpos com o anti-CCP isolado. A sensibilidade de 57% (IC 55 a 59%), bem menor que a do anti-CCP isolado, que foi de 67% (IC 65 a 68%). Enquanto a especificidade estimada dos dois anticorpos juntos foi de 96% (IC, 96 A 97%), ligeiramente maior que a do anti-CCP isolado 94% (IC 93% a 94%). Também foram estimadas as razões de verossimilhança positiva para os dois anticorpos juntos, que foi de 13.8, comparada a 9.8 para o anti-CCP isolado. De forma geral, a análise demonstrou que a combinação dos dois anticorpos teve boa capacidade de identificar a probabilidade de ter a doença caso seja positiva pela alta razão de verossimilhança, no entanto a sensibilidade foi reduzida considerando que os dois anticorpos juntos restringem a possibilidade de se identificar a proporção de indivíduos que tem a condição alvo, no caso a AR (Sun *et al.*, 2014).

2.9 ACURÁCIA DE NOVOS ANTICORPOS ANTIPROTEÍNAS CITRULINADAS

2.9.1 Anticorpos anti-SA

Uma meta-análise recente investigou a acurácia dos anticorpos anti-SA na Artrite Reumatoide. A análise incluiu nove estudos com 1905 pacientes com AR e 1667 controles (doentes ou saudáveis). A sensibilidade calculada foi de

39.5% (95% CI 36.5–42.4) e especificidade de 96.8% (95% CI 95.9–97.4) (Lee e Bae, 2017).

2.9.2 Anticorpos Anti-Tenascina C

A tenascina C é uma glicoproteína de matriz extracelular que é regulada positivamente durante a inflamação (Udalova *et al.*, 2011) e tem sido descrita sua associação com AR (Page *et al.*, 2012). Um estudo prévio avaliou anticorpos citrulinados anti-tenascina C em pacientes com AR, com osteoartrite e controles saudáveis. A avaliação de 1985 pacientes com AR de uma coorte suíça comparada a 160 controles saudáveis obteve uma sensibilidade de 47% e especificidade de 98%. Ao comparar soros de 280 pacientes com AR aos 330 pacientes com osteoartrite a sensibilidade foi de 51% e a especificidade de 98% (Schwenzer *et al.*, 2016).

2.9.3 Anticorpos Anti-Vimentina

Recentemente, uma meta-análise investigou a performance diagnóstica do anticorpo anti-vimentina citrulinada (MCV) (Lee *et al.*, 2015). Essa avaliação incluiu apenas estudos que avaliaram a acurácia do anti-CCP e anti-MVC. Os 12 estudos avaliados envolveram 2003 pacientes com AR e 831 controles saudáveis e resultou em sensibilidade de 68.6% (95% CI 66.6-79.7%) e especificidade de 94.2% (95% CI 92.4-96.7) para os anticorpos anti-vimentina. Nessa investigação, a sensibilidade da anti-vimentina C foi maior que a do anti-CCP, porém com menor especificidade. Ao fazer a análise comparando os pacientes com AR com controles doentes a sensibilidade foi de 68.4% (95% CI 66.3-70.5) e especificidade de 86% (95% CI 84.3 – 87.6) (Lee *et al.*, 2015).

3 METODOLOGIA

3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Um total de 135 pacientes com AR (127 mulheres, 8 homens, média de $53.5 \pm 11,3$ anos) foram recrutados do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC UFPE), no período de março de 2013 a dezembro de 2016. Os pacientes eram provenientes do ambulatório deste mesmo serviço. A terapia medicamentosa em uso foi registrada. O diagnóstico de AR foi estabelecido pela presença de 4 ou mais critérios do *American College of Rheumatology*(ACR) de 1987 (Arnett *et al.*, 1988) e do ACR/EULAR de 2010 (Aletaha *et al.*, 2010). Foram incluídos 68 voluntários sadios, sem doenças reumatológicas, como controles saudáveis. Como controles doentes, foram incluídos pacientes, com outras doenças reumatológicas, também oriundos do Serviço de Reumatologia. A saber, 29 pacientes com Fibromialgia, 48 pacientes com Osteoartrite, 60 pacientes com Esclerose Sistêmica e 131 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes e controles. Dados clínicos e laboratoriais foram coletados de registros do prontuário ou por ficha clínica específica e, posteriormente, revisados (vide APÊNDICE 2). A atividade de doença de cada paciente foi quantificada usando os escores de atividade CDAI e DAS28. Um total de 108 pacientes realizou radiografia de mãos e foram avaliados quanto à presença de erosões radiográficas. Os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFPE (PROTOCOLO CEP/CCS/UFPE Nº 339/10 E 1.486.537) (Apêndice 4 e 5).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE

Os pacientes com AR incluídos no estudo preenchem os seguintes critérios de inclusão:

1) classificados como portadores de AR pelos critérios do ACR de 1987 (Arnett *et al.* 1988) ou pelos critérios do ACR/EULAR 2010 (Aletaha *et al.*, 2010).

2) Maiores de 18 anos.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DO GRUPO CONTROLE

Para os controles doentes foram incluídos pacientes:

1) Classificados como portadores de Fibromialgia, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Osteoartrite e Esclerose Sistêmica pelos critérios do Colégio Americano de Reumatologia para cada doença (Altman *et al.*, 1986; Altman *et al.*, 1990; Wolfe *et al.*, 1990; Altman *et al.*, 1991; Hochberg, 1997; Van Den Hoogen *et al.*, 2013).

2) Maiores de 18 anos.

Para os controles saudáveis:

1) Indivíduos sem diagnóstico de nenhuma doença reumatológica ou com queixas reumatológicas;

2) Maiores de 18 anos.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO PARA TODOS OS INDIVÍDUOS

1) Sobreposição de doenças reumatológicas;

2) Menores de 18 anos;

3) Gestantes;

4) Portadores de neoplasias.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

Citocinas do plasma foram quantificadas pelo método ELISA de acordo com as recomendações dos fabricantes (R&D Systems). Os limites inferiores de detecção para as análises foram: 31.25pg/mL para IL-29 e para IL-22.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram avaliados por análise univariada, usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A correlação dos níveis de citocinas e parâmetros clínicos e laboratoriais foi realizada pela análise de Pearson.

Para o cálculo de indicadores de acurácia foi utilizado o software MedCalc V 17.9.7. Os valores de *cut-off* ótimos foram calculados para determinar a melhor sensibilidade e especificidade através do *Young Index*. A curva ROC (do inglês, *receiver-operating characteristic*) foi estabelecida e as áreas sob a curva (AUC, do inglês *área under the curve*) foram calculadas para avaliar o desempenho das citocinas estudadas em distinguir Artrite Reumatoide de outras doenças e de controles saudáveis. Todos os valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva foram descritos com um nível de confiança de 95%.

Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$. Todos os testes foram bicaudais. Todos os gráficos e dados quantitativos foram tabulados e analisados utilizando o programa Graph Pad Prism versão 6.01.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1: ACCURACY DATA ON NOVEL DIAGNOSTIC BIOMARKERS IN RHEUMATOID ARTHRITIS: BEYOND IMAGE STUDIES

Diversos estudos de acurácia em Artrite Reumatoide (AR) têm sido publicados nos últimos anos, reforçando a necessidade da busca de novos biomarcadores de diagnóstico para a doença. Esse artigo tem como objetivo revisar os estudos de acurácia em AR publicados nos últimos cinco anos que avaliaram novos biomarcadores para identificar pacientes com AR. Novos anticorpos têm sido descobertos e reportados com bons resultados. Dentre os anticorpos, destacam-se os anticorpos antiproteínas carbamílicas, anticorpos anti-PAD4 e anti-RA 33. As citocinas IL-15, IL-18, IL-13, IFN- γ , IL-7, IL-17, IL-6 e TNF- α também foram descritas como marcadores de diagnóstico na AR. Outros candidatos a biomarcadores foram relatados nesta revisão. No entanto, estes necessitam de estudos adicionais devido aos poucos trabalhos encontrados. Esta revisão não incluiu estudos de acurácia com exames de imagem, visto que esta abordagem já está bem estabelecida no diagnóstico da doença. Devido a um amplo número de diferentes biomarcadores relatados nesta revisão, conclui-se que são necessários estudos adicionais envolvendo diferentes populações das estudadas nos trabalhos reportados e também com um número maior de pacientes. Além disso, a abordagem genômica, proteômica e metabolômica no diagnóstico parecem ser bastante promissoras.

Accuracy data on novel diagnostic biomarkers in rheumatoid arthritis: beyond image studies

Laurindo Ferreira da Rocha Junior, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, Hugo Deleon de Lima, Andrea Tavares Dantas, Ivan da Rocha Pitta, Maira Galdino da Rocha Pitta
From the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil.

Supported by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-IF) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

L.F. Rocha Jr, Phd Student, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas and Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

A.L.B.P. Duarte, PhD, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

M.J.B.M. Rêgo, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE;

H.D.Lima, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE;

A.T. Dantas, MS, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

I.R. Pitta, PhD, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE;

M.G.R. Pitta, PhD, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE.

Address correspondence to Dr. M.G.R. Pitta, UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, 50670-901, Brazil. E-mail: mgrpitta@gmail.com

Running title: Rocha Jr, et al: novel diagnostic biomarkers in rheumatoid arthritis.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory chronic disease characterized by peripheral and symmetrical polyarthritis leading to joint damage and cartilage destruction. Currently, the diagnosis of RA is mainly based on the clinical symptoms, imaging results and some traditional laboratory tests. This review focuses on the studies published in the last five years on accuracy of novel diagnostic biomarkers in rheumatoid arthritis. New antibody specificities have been reported with good results. The antibodies described in accuracy studies are anti-carb P antibodies, Anti-carbamylated Vimentin, anti-PAD4, anti-RA33, anti-ROS-CII, anti-MDA modified peptide adducts and anti-

CD26 IgG antibodies. Cytokines also have been reported such as IL-15, IL-18, IL-13, IFN- γ , IL-7, IL-17, IL-6 e TNF- α . Other candidates that have been searched in the last five years that are reported in this review may demand additional studies with different populations and larger number of patients. new technologies to assess the impact of genomics, proteomics, and metabolomics on the diagnosis of RA are promising.

BACKGROUND

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory chronic disease characterized by peripheral and symmetrical polyarthritis leading to joint damage and cartilage destruction. RA chronicity results in decline in physical function, in quality of life and increased morbidity and mortality (Kitas e Gabriel, 2011; Cross *et al.*, 2014).

Efforts to establish the diagnosis early has become an essential issue in clinical practice for initiating treatment promptly, blocking disease progression and improving patient outcomes (Contreras-Yáñez e Pascual-Ramos, 2015; Emery *et al.*, 2015).

Currently, the diagnosis of RA is mainly based on the clinical symptoms, imaging results and some traditional laboratory tests. No diagnostic criteria exist for rheumatoid arthritis (Smolen *et al.*, 2016). Although the ACR 1987 (Arnett, 1988) and ACR/EULAR 2010 (Aletaha *et al.*, 2010) are widely used with diagnostic purposes, these set of criteria are made to insert patients in clinical studies. Diagnosis is obviously an area where new biomarkers are still essential.

Diagnostic Biomarkers are defined as anatomical, physiological, biochemical, molecular parameters or imaging features that can be used to refine diagnosis (Burska *et al.*, 2014). These parameters aim to assess the risk or the presence of a disease and can be detected and measured by a variety of methods including physical examination, laboratory assays, and medical imaging (Verheul *et al.*, 2015). This review focus on the studies published in the last five years on accuracy of novel diagnostic biomarkers in rheumatoid arthritis. Accuracy measures such as specificity, sensibility, likelihood ratio, and ROC analysis described by the articles cited will be reported. As imaging

approach such as magnetic resonance imaging and ultrasound are widely described to RA diagnosis, these modalities will be not reported in this review.

METABOLIC BIOMARKERS

In Rheumatic disorders the perturbations caused by the disease will lead to changes in concentrations of certain metabolites and involvement of the activation of multiple pathways. In RA, by using multivariate statistics on descriptive experimental profiles obtained by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) or Mass Spectrometry (MS), it is possible to describe patterns of changes and biomarkers that are highly discriminatory for the perturbation and/or disease state (Piori *et al.*, 2013).

Concentration of metabolites were analyzed by Zabek and colleagues in 2016 by metabolomics approach of serum. The study reported an indication that twelve metabolites were relevant for the discrimination of 20 patients with rheumatoid arthritis and 30 healthy controls (Zabek *et al.*, 2016). The mean disease duration of RA patients was 12 ± 8.26 . The important metabolites identified were valine, isoleucine, 3-Hydroxyisobutyrate, lactate, alanine, acetate, NAC (N-acetylated glycoprotein), acetoacetate, acetone, creatinine, GPC (sn-glycero-3-phosphocholine)+ APC (andacetylphosphocholine) and histidine. Valine, isoleucine, lactate, alanine, creatinine, GPC + APC and histidine were lower in RA than healthy controls, while acetate, 3-Hydroxyisobutyrate, NAC, acetoacetate and acetone were higher. The ROC curve and the area under the curve (AUC) values of 0.893 indicated a excellent discriminant properties. Although in the text the authors mention that sensitivity and specificity were calculated the values of these measures were not described (Zabek *et al.*, 2016).

Urine metabolome profiling was determined using nuclear magnetic resonance and studied as diagnostic biomarkers of various immune mediated diseases in 1200 patients and in 200 healthy controls by Alonso *et al.* With a final set of 37 unique identified metabolites, the prediction accuracy calculated for RA yielded a AUC of 0.70 (95 % CI, 0.65–0.75) (Alonso *et al.*, 2016).

Madsen *et al.* compared the metabolic profile of patients with RA with healthy controls and patients with psoriatic arthritis (PsA). Using the detection of

52 metabolites the accuracy of the approach for classifying 25 RA patients versus 10 healthy controls resulted in a sensitivity of 81% and a specificity of 67%. Patients with RA could be distinguished from PsA patients with a sensitivity of 90% and a specificity of 94%. Compared to PsA patients, glutamine, succinate, heptanoic acid, pseudo uridine, guanosine, inosine, arabitol, cystine, phosphoric acid and cysteine, and were increased in RA patients. As for aspartic and glutamic acid, arachidonic acid, glutamate, histidine, serine, cholesterol, 1-monooleoylglycerol and threonic acid, they were all decreased compared with PsA patients (Madsen *et al.*, 2011).

Another study by Surowiec *et al.* determined the metabolite and lipid profiling of plasma samples from 30 individuals prior to onset of RA and from 19 healthy controls. The samples were subjected to liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS) metabolite and lipid profiling. Although the authors do not report data on sensitivity and specificity, the AUC for the compounds analysed were revealed: oleic acid AUC = 0.67, β -hydroxypalmitic acid AUC = 0.67, kynurenine AUC = 0.66, hypoxanthine AUC = 0.69, lysophosphatidylcholines (16:0) AUC = 0.69, lysophosphatidylcholines (14:0) AUC = 0.70 and 3-indolelactic acid AUC = 0.65 (Surowiec *et al.*, 2016).

HISTOPATHOLOGICAL MARKERS

A recent review reports the accuracy of the histopathological synovitis score. The synovitis score evaluates the immunological and inflammatory tissue changes of synovitis. The authors state that using the synovitis score it is possible to distinguish between degenerative/posttraumatic diseases (low-grade synovitis) and inflammatory rheumatic diseases (high-grade synovitis) with a sensitivity of 61.7% and a specificity of 96.1%. The diagnostic accuracy according to the ROC analysis was reported as good, therefore no data was shown. It is noteworthy to point that this score can distinguish inflammatory arthropathies such as RA from degenerative arthritis, but is not able to identify RA among other inflammatory arthritis such as spondyloarthritis (Krenn *et al.*, 2017).

PROTEOMICS

Li and colleagues constructed a classification tree model based on serum proteomic biomarkers specific for RA. This classification model could separate patients with RA from diseased and healthy controls with sensitivity of 84.0% and specificity of 92.5%. To estimate the accuracy of the model, the authors included 25 patients with RA, 25 patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE), 25 patients with Sjögren Syndrome (SS) and 25 healthy controls. Eighty-three protein peaks significantly varied between RA and other control groups. Of these peaks, 25 were up-regulated and 58 were down-regulated in patients with RA in comparison to controls. Patients with RA had disease duration of less than 12 months. The specificity and sensitivity of the model were 80.0% and 93.3%, respectively. The AUC for the model was 0.926(Li *et al.*, 2015).

SERUM AMYLOID 4 PROTEIN

SAA4 is a member of the constitutive serum amyloid A (SAA) isotype. The SAA is reported to be involved in joint destruction via matrix metalloproteinases. (Connolly *et al.*, 2012). The Serum amyloid isotype 4 (SAA4) was significantly up regulated in serum samples of 40 individuals with high titres of Rheumatoid Factor (RF) and of 40 RA patients compared with sera from 40 healthy individuals with normal levels of RF. This study calculated the ROC curves of C-reactive protein (CRP) and SAA4 in the high-RF individuals. The AUC values for CRP and SAA4 were 0.584 and 0.700, respectively. In RA patients the AUC for CRP was 0.598 and for SAA4 0.717. Thus, the authors highlight that SAA4 seems to be superior to CRP as an RA marker. Furthermore, combining SAA4 and CRP the AUC value was 0.757. The accuracy of the combination was also calculated and improved from 59.8% to 75.7%. However, disease duration, sensitivity and specificity were not reported (Seok *et al.*, 2017).

LYMPHOCYTE-MONOCYTE RATIO

Du *et al.* recently examined the lymphocyte-monocyte ratio (LMR) levels in RA patients and determined its diagnostic performance in distinguishing RA

patients among osteoarthritis (AO) patients and healthy individuals. The median disease duration was 5.5 years (range 2.8–10). LMR levels of the 66 RA patients were significantly lower than those of the 163 OA patients and of the 131 healthy controls. The specificity of distinguishing RA from OA patients was 82.82% and the sensitivity was 45.45%. The area under the curve of LMR had a moderate value of 0.705 (0.630–0.781). This study also determined neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR) in RA and OA patients. The AUC for NLR was 0.668 (95%CI = 0.592–0.745) and for PLR was 0.717 (95%CI = 0.644–0.789) (Du *et al.*, 2017).

B CELL RECEPTORS

Tak *et al.*, recently evaluated the accuracy of B Cell Receptors (BCR) clones of paired peripheral blood from 21 *at risk* for RA individuals (elevated ACPA and/or IgM-RF without any signs of arthritis). Patients were classified as “BCR-clone positive” in the presence of ≥ 5 dominant BCR clones and as ‘BCR-clone negative’, when < 5 dominant BCR clones were present and denominated this method as the BCR-clone model. The cut-off of ≥ 5 dominant clones in peripheral blood resulted in two clearly distinguishable groups: one that developed RA and the other with patients who did not develop RA. The corresponding sensitivity of 78%, specificity of 92%, positive predictive value (PPV) of 72%, negative predictive value (NPV) of 94% and the area under the curve was 0.903. These findings were validated in a second independent cohort of 50 subjects (Tak *et al.*, 2017).

MONOCYTE CHEMOTACTIC PROTEIN-1

Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) is a chemokine with a ubiquitous production, in particular by adipocytes. This chemokine is associated with inflammation through attracting monocytes and macrophages, which are important cells involved in RA pathogenesis (Deshmane *et al.*, 2009). Arkema *et al.* conducted a study with 220 women with RA and 675 healthy controls. Sera from the RA patients were obtained before disease diagnosis and symptoms.

The sensitivity for MCP-1 was 36.8% and specificity was 75%. When analyzing only patients who had their blood collected within five year of diagnosis the sensitivity increased to 43.1% and specificity had a slight decrease to 74.1% (Arkema *et al.*, 2015).

SERUM MATRIX METALLOPROTEINASE-3

Ma J *et al.* investigated the diagnostic performance of 191 patients with RA compared to 58 healthy subjects. The ROC analysis demonstrated an optimal cut-off point of 84mcg/L for diagnosing RA and the AUC value of 0.822 in women and 168 mcg/L with AUC of 0.824 in men. Data on specificity and sensitivity could not be obtained because the article is in Chinese language (Ma *et al.*, 2015).

CARTILAGE OLIGOMERIC MATRIX PROTEIN

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), a cartilage-derived marker of cartilage breakdown, has been reported as a prognostic factor in RA (Tseng *et al.*, 2009). Liu and colleagues examined the role of COMP serum levels in the diagnosis of RA. Eighty-two patients with RA and 34 healthy control subjects yielded a sensitivity of 0.817 and specificity of 0.882 for RA. The AUC for this analysis was 0.864 (95% CI 0.790- 0.937). The optimal calculated cut-off value for COMP was 21.51 ng/ml. The mean disease duration was 3.79 ± 5.45 years. Compared to anti-CCP levels of the subjects enrolled COMP had higher sensitivity and slightly lower specificity. Of note, the AUC for COMP was higher than for anti-CCP (Liu *et al.*, 2016).

VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS

Brekelmans *et al.* evaluated the diagnostic accuracy of breath prints using an electronic nose which the author called a “an innovative method to measure the complete spectrum of volatile organic compounds (VOCs)” (Brekelmans *et al.*, 2016). These volatile compounds are derived from multiple metabolic and inflammatory processes and are present in the exhaled breath of

patients with systemic diseases such RA (Buszewski *et al.*, 2007). Twenty-one RA patients, 18 PsA patients and 21 healthy controls were enrolled in the study. Breath prints of RA patients vs. controls yielded a sensitivity of 76% (95% CI 53–92%) with specificity of 67% (95% CI 43–85%). The summary positive LR and negative LR was 2.3 and 0.3, respectively and the AUC was 0.75. When compared to PsA patients the calculated sensitivity was 71% (95% CI 47–90%) and specificity was 72% (95% CI 48–89). The positive and negative LRs were 2.5 and 0.40, respectively. The AUC was 0.72 (Brekelmans *et al.*, 2016).

PROGLANULIN

Progranulin is an autocrine growth factor reported to be bounded directly to tumor necrosis factor (TNF) receptors (Tang *et al.*, 2011). It well known that TNF is a key cytokine in RA pathogenesis (McInnes e Schett, 2011). Serum progranulin levels were determined by ELISA in sera from 80 patients diagnosed with RA and 60 healthy controls. ROC curve analysis for progranulin levels resulted in an AUC of 0.705 for RA versus normal controls. Interestingly the area under the ROC curve for progranulin levels in RA patients with high disease activity (DAS28 > 5.1) was 0.977 compared to normal controls. No yielded sensitivity or specificity was reported in this study (Chen *et al.*, 2016).

ADENOSINE DEAMINASE

Adenosine deaminase (ADA), an enzyme of purine metabolism is suggested to be a marker of cell mediated immunity and has also been reported to be higher in RA patients than healthy controls (Demir *et al.*, 2014). Vinapamula *et al.* analyzed ADA activity in serum from 46 RA patients and 46 healthy controls. The AUC for ADA was 0.776 (95% CI 0.667 - 0.856), with a sensitivity 82.61% and specificity of 65.2% and an optimal cut-off level of 25.3 IU/L (Vinapamula *et al.*, 2015).

14-3-3η

The 14-3-3 protein family consists of 7 isoforms that are intracellular chaperonin, present in eukaryotic cells. The levels of one of these isoforms, 14-3-3 η are increased in RA implicated in its pathogenesis as a novel joint-derived proinflammatory mediator (Verheul *et al.*, 2015). Maksymowych *et al.* investigated 14-3-3 η diagnostic performance in patients with early RA (n = 99) and RA established patients (n = 135) and compared with 385 controls (healthy and disease controls). The best serum cutoff level of 14-3-3 η (0.19 ng/ml) had a sensitivity of 77%, specificity of 93%, with a positive LR of 10.4 and an AUC of 0.89 for differentiating established RA from healthy controls. When comparing established RA with all controls, the same cutoff yielded a sensitivity of 77.4% and specificity of 86.0% (Maksymowych *et al.*, 2014).

IMUNOGLOBULINS

Assuming that levels of free κ (kappa) and λ (lambda) light chains could reflect B cell activation and could be related to the progress of RA, Ye and colleagues determined the accuracy of these chains in 80 patients with RA with a disease duration of 6 months to 20 years. Serum levels of free kappa and lambda chains in patients with active RA (n=40) were significantly higher than in those in remission (n=40) and healthy controls (n=40). The accuracy analysis included active RA patients compared to remission RA patients and healthy controls. The optimal cut-off points for each light chain were determined and yielded a sensitivity of 82.5% and specificity of 82.5% for serum free kappa and a sensitivity of 80% with specificity of 82.5% for serum free lambda. Further, the AUC for ROC curves in patients with active RA were 0.871 (95% CI 0.785-0.956) for free kappa light chain and 0.781 (95% CI 0.667-0.896) for lambda light chain (Ye *et al.*, 2013).

NOVEL ANTIBODIES

The most common antibodies in RA are rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated peptide/protein antibodies (ACPAs). These antibodies are essential diagnostic biomarkers as they have been included in the classification criteria of RA (Aletaha *et al.*, 2010). Previous studies have reported some other antibodies

that might be helpful in diagnosing RA, especially for the ACPA-negative patients. Summarizes the characteristics of the reviewed studies on novel antibodies are in the Table 1.

Antibodies against carbamylated proteins

Liubing Li et al. analyzed the accuracy of anti-carbamylated proteins (anti-CarbP) antibodies in a meta-analysis which included 7 studies that met the authors' criteria with a total of 6578 patients with RA. In these studies, the diagnostic sensitivity of the anti-CarbP antibody ranged from 36.2% to 47.7%, and the specificity ranged from 92.9% to 97.0%. The calculated overall sensitivity for anti-CarbP antibodies was 42% (95% CI, 38% to 45%) and specificity was 96% (95% CI, 95% to 97%). The positive LR and negative LR, respectively, were 10.2 (95% CI, 7.5 to 13.9) and 0.61 (95% CI, 0.57 to 0.65) (Li et al., 2016). This meta-analysis excluded studies assessing the diagnostic accuracy of the anti-CarP antibody for future RA. A recent study by Pecani et al. enrolled 309 patients with established RA to calculate the specificity and sensitivity of serum antibodies against carbamylated proteins (anti-CarbP). Anti-CarbP antibodies were present in 117 (37.9%) patients (Pecani et al., 2016b). Patients with other rheumatic diseases such as SLE, Sjögren syndrome (SS), Systemic Sclerosis (SSc), and postmenopausal osteoporosis (OP) were used as disease controls. Healthy controls were 98 subjects. For anti-CarbP antibodies the AUC from ROC analysis was 0.678 (95% CI 0.636–0.720). The authors compared this value with ROC analysis for ACPAs [0.858 (95% CI 0.830–0.887)] and for RF [0.796 (95% CI 0.761–0.831)]. Among the three antibodies determined, anti-CarbP antibodies had higher specificity but relatively lower sensitivity. The pooled sensitivity for Anti-CarbP was 46.8% (41.50–52.54) and specificity was 91.95% (82.25–94.77), with a positive likelihood ratio of 4.581. The mean disease duration of RA patients was 107 ± 97.6 months (Pecani et al., 2016a). Gan et al. evaluated the accuracy of anti-CarbP antibodies in sera from 76 RA patients before disease diagnosis and in 41 healthy controls. Two assays of ELISA were tested according to the carbamylated antigens generated: anti-CarbP-FCS and anti-CarP-Fib. Both assays had high specificity of 95.1% each, but low specificities: 26.3% for anti-

CarP-FCS and 15.8% for anti-CarP-Fib. The combination of anti-CCP2 and/or RF obtained 67% sensitivity and 73% specificity for future RA, with an AUC of 0.70. Addition of anti-CarP-FCS increased sensitivity to 68% and decreased specificity to 68%, with in an AUC of 0.68, which was not statistically different from the AUC for anti-CCP2 and/or ≥ 1 RF (Gan *et al.*, 2015). Shi *et al.* examined the accuracy of the anti-CarP antibody in sera from a cohort of 2086 patients with early arthritis. A total of 969 (47%) of all of the patients with arthritis met the 2010 ACR/EULAR criteria for RA after one year of symptoms. The sensitivity of anti-CarP antibodies in RA patients was 44 % and the specificity was 89 %. In the ACPA-negative RA patients from the same cohort the sensitivity and specificity were 12% and 91%, respectively. The likelihood for anti-CarP antibodies was 4.2, lower than anti-CCP2 (12.9) and RF (6.9) (Shi *et al.*, 2015).

Martínez *et al.* evaluated the accuracy of antibodies anti-carbamylated vimentin in 101 patients with RA, 50 disease controls and 51 healthy subjects. The AUC for anti-carbamylated vimentin IgM was 0.9111 (95% CI 0.872-0.950), with a sensitivity of 85.2% and specificity of 90.1%, with optimal cut-offs of 20 U/mL and 30 U/mL. Higher sensitivities were obtained by using combination with the other assays tested. For combination of anti-carbamylated vimentin or anti-CCP2, the sensitivity was 91.1 % and the specificity was 89.1% (Martínez *et al.*, 2016).

Anti-PAD4 antibodies

Antibody against peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) is a novel antibody described in RA patients in recent years. PAD4 is a deiminase involved in catalyzation of the amino acid arginine into citrulline (Suzuki *et al.*, 2007). A very recent meta-analysis, examined published data on the sensitivity, specificity, and likelihood ratios of the anti-PAD4 antibody detected by ELISA in diagnosing RA (Ren *et al.*, 2017). The 1987 American College of Rheumatology (ACR) criteria (Arnett *et al.*, 1988) or 2010 ACR/The European League Against Rheumatism (EULAR) criteria (Aletaha *et al.*, 2010) were used as the diagnostic standard of RA. The authors selected eight studies in which 662 RA patients were enrolled. In these studies, the sensitivity ranged from 23.5% to 60%, and

the specificity ranged from 82.4% to 100%. The pooled sensitivity of the anti-PAD4 antibody was 38% (95% CI 30-46%), and the specificity was 96%(95% CI 93-98%). Positive likelihood ratio (LR) was 8.96 and negative LR was 0.65(Ren *et al.*, 2017). The authors considered that the facts that none of the studies tested anti-PAD4 antibodies in seronegative RA which is a limitation of the meta-analysis.

Immunoprecipitation was used to detect anti-PAD4 antibody. This study evaluated sera from patients with established RA and with other rheumatic diseases, and healthy controls (Harris *et al.*, 2008).Anti-PAD-4 antibodies were present in 16 (42%) of 38 RA patients, compared with none of 32 healthy controls and 1 (0.8%) of 126 control patients (31 patients with scleroderma, 31 patients with myositis, 32 patients with primary Sjögren's syndrome, and 32 patients with systemic lupus erythematosus) ($p \leq 0.0001$). These findings yielded a sensitivity of 42% and a specificity of 99% for RA(Harris *et al.*, 2008).

Anti-RA33 antibodies

A recent meta-analysis by Yang and colleagues evaluated the diagnostic performance of the anti-RA33 antibody for RA (Yang *et al.*, 2016). This antibody is directed to a protein with approximately 33KD of molecular mass, contained in nuclear extracts from HeLA cells (Hassfeld *et al.*, 1989). The study analyzed 50 studies with a total of 5003 RA patients in which most used method was ELISA to detect anti-RA33 and 3 articles used Western blotting method. The control groups varied and included healthy individuals, non-RA rheumatic diseases or both. The pooled sensitivity was 33% (95% CI: 31% – 34%) and specificity was 90% (95% CI: 89% – 90%). The AUC for ROC analysis was 0.6863. Positive likelihood ratio and negative likelihood ratio were 3.92 and 0.75, respectively. Data on disease duration were not mentioned in the study(Yang *et al.*, 2016).

Autoantibodies to Posttranslationally Modified Type II Collagen

Type II collagen (CII) is an important component of human articular cartilage and a prominent target for posttranslational chemical modification by

reactive oxygen species (ROS) in joints with arthritis (Cantagrel e Degboe, 2016). Autoimmune reactivity against ROS-modified CII has been reported as CII is a documented autoantigen in RA (Nissim *et al.*, 2005). Strollo and colleagues investigated the potential use of anti-ROS-CII autoantibodies as a diagnostic biomarker of RA. The sensitivity and specificity of anti-ROS-CII antibody in 85 patients with early RA (symptoms less than 1 year) compared to 51 healthy controls were 92% and 98%, respectively and when compared to patients with arthralgia and anti-CCP positive but with no signs of synovitis the sensitivity and specificity were 92% and 93%, respectively. The AUC was not reported in this work (Strollo *et al.*, 2013).

Autoantibodies against malondialdehyde-modified peptide adducts

Malondialdehyde (MDA), a byproduct of a lipid peroxidation process in which free radicals easily depolymerize polyunsaturated fatty acids in lipids. This process takes part in inflammatory arthritis pathogenesis. Additionally, MDA can trigger secondary protein modification and was up regulated in RA patients. (Vasanthi *et al.*, 2009). A very recent study, assessed whether the isotypes of autoantibodies against MDA-modified peptide adducts can distinguish RA patients from OA patients and healthy controls. Serum Igs G and M against MDA-modified peptides showed better diagnostic performance in differentiating among 45 patients with RA, 30 patients with OA and 45 healthy subjects. The performance of anti-MDA-modified peptide IgG and IgM resulted in an AUC of 0.96–0.98, sensitivity of 88.9%–97.8%, and specificity of 88.9%–100% (Liao *et al.*, 2018).

Anti-Dipeptidyl peptidase IV antibodies

Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV/CD26) activity has been associated to contribute to RA as patients are reported to have lower levels of DDP-IV. Expression of DPP-IV on T subsets correlated with disease activity (Cordero *et al.*, 2015). Cordero *et al.* evaluated levels of Anti-CD26 antibodies in 110 RA patients and 50 healthy controls. Anti-CD26 Igs showed sensitivity of 82% and specificity of 96% and their levels differed amongst the different groups of

patients stratified by the type of therapy (biologics and non-biologics). The optimal cut-off value was with cut-off 2.85 µg/mL (Cordero *et al.*, 2017).

Combined antibodies

The combination of levels of autoantibodies were analyzed by Sun *et al.* The autoantibodies of the 350 patients with mean disease duration of 9.34 ± 8.79 years enrolled included rheumatoid factor (RF), anti-cyclic citrullinated peptide (CCP), mutated citrullinated vimentin (MCV), anti-keratin antibodies (AKA), anti-perinuclear factor (APF), and Ig heavy chain binding protein (BIP) (Sun *et al.*, 2017). The control groups consisted of 98 patients with other autoimmune diseases (SLE, n=40, SS, n=30 and Ankylosing spondylitis, n=28) and 100 healthy volunteers. Levels of Antibodies to BIP yielded a specificity of 84.62% and sensitivity of 62.57% for RA. The authors analyzed the combination of one, two, three, four, five or six antibodies. When one autoantibody was detected additionally to anti-CCP antibody or to BIP, the better specificity (95.92%) with different sensitivities were obtained. Although increasing the detected number of autoantibody from two kinds to three or four, the specificity was improved, but with no statistical significance. Combined and tandem determination of four antibodies (CCP+AKA+APF+BIP) showed the highest specificity (97.96%). Continuing add the types of antibodies combined detected enhance nor the specificity neither sensitivity (Sun *et al.*, 2017). The latter was 55.79% for four or more antibodies tested. No AUC were reported in this work.

CYTOKINES

In 2012, Pavkova Goldbergova *et al.* determined serum IL-15 levels in 144 patients with Rheumatoid Arthritis (RA) and compared to 55 healthy controls. Interleukin-15 levels were higher in RA patients and this cytokine had 74.8% of sensitivity and 70.4% of specificity for identifying patients with RA when compared to anti-CCP antibody levels. The AUC for IL-15 was similar to anti-CCP in this study (0.800 vs. 0.807). This work could determine an optimal cut-off value for IL-15 in predicting RA and showed that enhanced a model of RA prediction containing rheumatoid factor and anti-CCP. It is important to

point that RA patients in this study had long period of disease duration (median 11.0 years) (Pavkova Goldbergova *et al.*, 2012).

In 2010, Kokkonen *et al.* demonstrated that some cytokines, cytokine related-factors, and chemokines are expressed in serum of 86 RA patients prior to the development of the disease. The sensitivity and specificity of these markers for the development of RA were calculated compared to 256 healthy subjects. The highest sensitivity for predicting RA was for eotaxin 22.4% and specificity was 95.3%. The other predictors analyzed were IL-1RA, IL-2, GM-CSF, IFN-gamma, IL-4, IL-9, TNF-alfa, IL-12, IL-10, IL-1beta, IL-6, monocyte chemoattractant protein-1, IL-15, IP-10. All of them yielded low sensitivities but had high specificity (>95.3%). The combination of anti-CCP antibodies and the cytokines stratified for Th cell phenotype (Th1 and Th2) or general activation demonstrated sensitivities of 14.1%, 12.9%, and 20%, respectively, at a specificity of 100%. Based on an analyses including all cytokines and chemokines the sensitivity of 51.2% for predicting RA among patients before disease onset and healthy controls, with all analyzed factors and anti-CCP antibodies included, with a specificity of 91.9% (Kokkonen *et al.*, 2010).

The serum levels of soluble human interleukin-18 receptor alpha complex (IL-18Ra) was highly expressed in sera from 145 RA patients and adult onset Still's disease compared to healthy controls, OA patients and SLE patients. The ROC-AUC analysis for the serum level of the IL-18Ra complex to discriminate RA among SLE, OA and healthy subjects was 0.826, corresponding to a specificity of 87.6% and a sensitivity of 66.2%. This study demonstrated the ROC-AUC analysis for the serum IL-18 level of 0.626. The optimal cutoff value of serum IL-18 yielded low specificity (40.9%) and high sensitivity (83.5%). The specificity of serum IL-13 was 82.5% and the sensitivity was 67.6%, with the ROC-AUC OF 0.740. The ROC-AUC analysis for the serum IFN- γ levels was 0.656, the specificity was 62% and the sensitivity was 65.5%. Taken together, these data suggest that the serum level of the sIL-18Ra complex is better able to discriminate RA patients than the serum levels of IL-18, IL-13 or IFN- γ . These findings suggest a potential clinical application as a biomarker for the diagnosis or differential diagnosis of RA. The disease duration of RA patients was not mentioned in this study (Takei *et al.*, 2011).

Goeb et al, demonstrated that low serum IL-7 was a good predictor of development of RA in 250 patients from the very early arthritis (VErA) cohort which comprised patients with less than six months of symptoms. In ACPA negative patients (n=199) low IL-7 levels was the most specific biomarker with 27.5% of sensitivity and specificity of 83%. Whereas in the whole cohort low IL-7 levels demonstrated a sensitivity of 28% and specificity of 83%. There was a loss in sensitivity when combining ACPA with IL-7 suggesting that these biomarkers are independent and might be of diagnostic value for patients with no ACPA antibodies. This study also suggested a role of this cytokine as a prognostic and for monitoring disease response to therapy (Goeb *et al.*, 2013).

The diagnostic performance of IL-13 and IL-17 was investigated by Silosi et al. The study included 30 patients diagnosed with early rheumatoid arthritis and 28 healthy persons. For IL-13 the AUC was 1.00, with a sensitivity and specificity of 100%, and an optimal cut-off value of 10.73 pg/mL. Whereas IL-17 yielded an AUC of 0.902, with sensitivity of 86.67%, specificity of 100% and the best cut-off value was 9.40 pg/mL. The positive LR for IL-13 and for IL-17 were high, 28 and 24.17, respectively (Silosi *et al.*, 2016).

Using the CART (classification and regression trees) method, a tool used to create a classification algorithm, Azizieh and colleagues obtained a prediction accuracy of 64% and provided information on the cytokines used to classify the two groups analyzed: RA patients (n=26) and healthy controls (n=28). The cytokines from plasma that demonstrated importance in this method were TNF- α , IL-4, IL-12 e IL-6. Looking into prediction accuracy using the CART method for the cytokines measured in the PBMC cultured with mitogen supernatants, they obtained a prediction accuracy of 69%. The most important cytokines for these analyses were IFN- γ , IL-17, and IL-10. This study has several limitations as it did not report sensitivities, specificities or any other accuracy measures in the scope of the article. The disease duration of the patients enrolled was not mentioned either (Azizieh *et al.*, 2017).

Recently, Silosi and colleagues, analyzed the diagnostic performance of serum IL-6 and TNF- α to distinguish 30 patients with early RA (less than 12 months from onset of arthritis) from 28 healthy individuals. Serum IL-6 concentration indicated presence of RA with 100% accuracy with an optimal cut-off value of 8.75 pg/mL. The positive and negative likelihood ratios were as

follows 14.00 and 1.12, respectively. Both sensitivity and specificity were 100%. The calculated cut-off value for discrimination between patients with RA and controls for TNF- α was 10.50 pg/mL. The likelihood ratios were: LR(+) = 25.20 and LR(-) = 1.04 with sensitivity and specificity equal to 90.00% and 100%, respectively. The AUC was 1.000 for IL-6 and 0.950 for TNF α . Although this study also evaluated the diagnostic performance of these cytokines for patients infected with hepatitis C virus (HCV) the accuracy of both IL-6 and TNF- α to distinguish RA patients from HCV patients was not calculated (Silosi *et al.*, 2017). Summarizes the characteristics of the reviewed studies on cytokines are in the Table 2.

GENETIC STUDIES

Johansson *et al.* analyzed relationships between the PTPN22 1858 polymorphism and anti-CCP, RFs and the shared epitope (SE) gene (HLA-DRB1*0404 or 0401). They evaluated 92 individuals who had donated blood samples prior to developing RA and compared to 368 healthy controls. The calculated sensitivity of PTPN22 1858T carriage for identifying patients who developed RA (prepatients) was lower (39.3% 95% CI 29.6–49.7) compared with HLA-SE (55.6%, 95% CI 45.2–65.6) but of similar magnitude as the presence of anti-CCP antibodies (37.1%, 95% CI 27.5–47.5). Therefore, specificity was greater with PTPN22 1858T carriage (80.3%, 95% CI 75.9–84.1) than with HLA-SE (61.8%, 95% CI 54.4–68.9) but less than with anti-CCP antibodies (98.6%, 95% CI 96.9–99.5). The combination of anti-CCP antibodies and PTPN22 resulted in a specificity of 100%. The positive likelihood ratios were as follows: anti-CCP antibodies 26.2, the PTPN22 1858T variant had 2.0 and HLA-SE had 1.5. The combination of carrying both HLA-SE and PTPN22 1858T variant had a likelihood ratio of 3.4 (Johansson *et al.*, 2006).

Potenciano *et al.* have conducted extensive research to explore algorithm under very different approaches to model individual risk to complex diseases including RA from the Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) from genome-wide data. By a boosting approach the study achieve a high accuracy and the authors suggest that this genetic approach can be used in clinical practice. The AUC for RA was 0.8087. As data was extracted from

genome sources the sensitivity and specificity as well as the patient's characteristics were not reported (Potenciano *et al.*, 2016).

Karlson and colleagues analyzing a risk model to predict RA development examined 317 Caucasian seropositive RA cases and 551 healthy controls. The model constructed combined variables such as epidemiologic and environmental (eg. Year of birth, smoking, alcohol), genetic factors (thirty-one validated risk alleles for RA) and gen-environment interactions (eg. HLA-SE and smoking). The analysis showed an AUC of 0.716 (95% CI 0.681-0.755) for distinguishing RA from healthy controls (Karlson *et al.*, 2013).

Using deep exon sequencing and large-scale genotyping of 25 biological candidate genes located within RA risk loci discovered by genome-wide association studies (GWASs), Diogo *et al* studied 500 RA cases and 650 controls. By identifying the risk alleles for RA the authors determined a sensitivity of 99%. Data on specificity or LR were not described in the published study (Diogo *et al.*, 2013).

MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that bind to 3' untranslated regions of messenger RNA. As it is reported that miRNA alterations affect important cellular functions in RA (Nagata *et al.*, 2009). Murata and colleagues hypothesized that miRNAs could be diagnostic biomarkers in RA. The study resulted in a formula for Estimated Probability of RA by plasma MiRNA (ePRAM), employing the assays miR-24, miR-30a-5p and miR-125a-5p, which showed increased diagnostic accuracy with AUC value of 0.89. When analyzed separated the highest AUC was found for miR-125a-5 (AUC: 0.83, sensitivity 64.7%, specificity 89.5%), followed in order by miR-24 (AUC:0.80, sensitivity 63.7% and specificity 89.5%) and miR-26a (AUC:0.80, sensitivity 53.9% and specificity 94.3%)(Murata *et al.*, 2013). Posteriorly a study by Ormseth *et al* included 168 patients with RA and 91 control subjects. The mean disease duration of RA patients were 10 years. Utility of plasma miRNA concentrations for RA diagnosis was assessed by the calculation of the AUC for various miRNAs assays. The higher AUC was obtained with the combination of miR-24-3p, miR-26a-5p and miR-125a-5p with the value of 0.747 (95% CI

0.683-0.810). When each miRNA assay was analyzed isolated the higher AUC was for miR-15a-5p, with the value of 0.716 (95% CI 0.651-0.780) (Ormseth *et al.*, 2015).

Besides plasma studies, expression of miR-146a, miR-155, and miR-223 was evaluated in synovial tissue of 50 RA patients and 37 patients with OA by Kriegsmann and colleagues. Patients with RA had higher expressions of the miRNAs investigated. The sensitivity and specificity for the detection of RA of miR-146a was 76% and 80%, respectively. For miR-155 the sensitivity was 80% and specificity was 81%. A for miR-223 sensitivity was 86% and specificity was 81%. The highest AUC was obtained by the combination of miR-155 and miR-223, with the value of 0.92 and specificity of 84% and specificity of 92%(Kriegsmann *et al.*, 2016).

Gene Expression Signatures

Gene expression profiles of synovial biopsies were described to be significantly different according to the underlying disorder determined by high-density transcriptomic studies (Nzeusseu Toukap *et al.*, 2007). Lauwerys *et al.* using synovial biopsy samples analyzed gene expression of 7 patients with RA, 5 patients with OA, 4 patients with SLE, 4 patients with PsA and 5 with microcrystalline arthritis. This study could identify the 100 most discriminant probes and verified that these probes belong to pathways associated to the pathogenesis of several forms of arthritis: T and B cell activation. The transcriptomic analysis obtained sensitivity for RA of 70.5%. Data on specificity or ROC curve analysis were not reported (Lauwerys *et al.*, 2015). Furthermore, a study used three multicenter genome-wide transcriptomic data sets from 79 individuals infer rule-based classifiers to discriminate 33 patients with RA, 26 AO patients, and 20 healthy controls. The mean sensitivity for the prediction of RA was 96% (range 90% to 100%) and specificity was 94%(range 80% to 100%)(Woetzel *et al.*, 2014).

In addition, the expression levels of 7 type I IFN response genes were determined with multiplex qPCR and analyzed in 115 seropositive arthralgia patients who were followed for the development of arthritis, 25 pre-symptomatic individuals who developed RA later and 45 controls. The IFN-score resulted in

an AUC of 0.602 (95% CI 0.491 - 0.714) and the combination of anti-CCP/RF and IFN-score gave an AUC of 0.785 (95% CI 0.699 - 0.872) (Lubbers *et al.*, 2013).

Miscellaneous

A meta-analysis published recently by McNally *et al.* evaluated the accuracy of the Leiden clinical prediction rule (CPR) (McNally *et al.*, 2014). This model was developed in 2007 to estimate the likelihood of progression from patients with undifferentiated arthritis to RA and consisted of nine clinical variables including age, sex, localization of symptoms, morning stiffness, tender joint count, swollen joint count, C-reactive protein level, IgM rheumatoid factor positivity and the presence of anti-CCP antibodies (Van Der Helm-Van Mil *et al.*, 2007). The meta-analysis reviewed data from 4 articles that met the inclusion criteria with a total of 1084 participants. According to the identified optimal cut-off point for determining progression to RA (≥ 9), the greater specificity was 99% (95% CI 95–100%), sensitivity was 0.31 (95% CI 24–37%) and a positive LR of 22.9. However, the authors point that a lower cut-off value (≥ 8) would identify a significant proportion of patients who were at risk of developing RA with positive LR of 9.5 and sensitivity and specificity of 49% (95% CI 43-55%) and 95% (95% CI 92-97%), respectively (McNally *et al.*, 2014).

Glycans are carbohydrates attached to proteins or peptides and changes in glycan conformations have been linked to a variety of autoimmune conditions (Zhang, 2006). Sebastian *et al.* quantified plasma IgG N-linked glycans from 128 RA patients and 195 healthy participants. Among the total 24 glycan peaks identified, the main results were related to the glycan GP1 with an AUC of 0.881. Besides GP1, others GPs were higher in RA: GP2, GP22 and GP24. All the four GPs combined had an AUC of 0.928. No data on sensitivity or specificity were reported (Sebastian *et al.*, 2016).

CONCLUSIONS

There is an unfulfilled clinical need for novel biomarkers predictive or diagnostic of RA. Recently, new antibody specificities have been reported with

good results. Other candidates that have been searched in the last five years that are reported in this review may demand additional studies with different populations and larger number of patients. As many patients are positive for various biomarkers it would be interesting to combine these biomarkers to investigate whether combining this information will provide more insight regarding the diagnosis.

Many apparently healthy people may present some of the markers described in the present review before onset of disease and it remains a focus of current research whether healthy subjects in the general population with these markers are predetermined to develop RA.

Of note, new technologies to assess the impact of genomics, proteomics, and metabolomics on the diagnosis of RA are promising. New opportunities have emerged for RA diagnosis and the search for novel markers to identify RA is a major challenge.

Tabela 1. Characteristics of studies on new antibodies published in the last 5 years									
Authors	Antibody tested	Design	Number of patients		Sensitivity	Specificity	AUC	+LR	Observations
			RA	Controls					
Liunbing Li et al.	Anti-CarbP	Meta-analysis	6578	NR	42%	96%	0.80	10.2	Predictive studies were excluded from analysis.
Pecani et al.		Case-control	117	HC=98	46.8%	91.95%	0.678	4.581	-
Gan et al.		Predictive	76	41 ^a	15.8%, 26.3% ^b	95.1%	0.72	NR	-
Shi et al.		Predictive	969	305	44%	89%	0.67	4.2	-
Martinez et al.	Anti-carbamylated Vimentin	Case-control	101	HC=51 DC=50	85.2%	90.1%	0.9111	NR	-
Ren et al.	Anti-PAD4	Meta-analysis	662	NR	38%	96%	0.86	8.96	Studies included did not test seronegative RA
Harris et al.		Case-control	38	HC=32 DC=126	42%	99%	NR	NR	-
Yang et al.	Anti-RA33	Meta-analysis	5003		33%	90%	0.6863	3.92	-
Strollo et al.	Anti-ROS-CII	Case-Control	85	51	92%	98%	NR	NR	-
Liao et al.	Anti-MDA modified peptide adducts	Case-control	45	HC=45 DC=30	96% and 98% ^c	88.9% and 100% ^c	0.96 and 0.98 ^c	NR	-
Cordero et al.	Anti-CD26 IgG	Case-control	110	50	82%	96%	NR	NR	

RA: Rheumatoid Arthritis; AUC: Area Under the Curve for ROC analysis; LR: Likelihood Ratio; Anti-CarbP: Anti-Carbamylated Proteins antibodies; HC: Healthy Controls; DC: Disease Controls; Anti-PAD4: Antibody against Peptidyl Arginine Deiminase 4; Anti-ROS-CII: Antibodies ROS-modified collagen II; NR: Not Reported

^ahealthy controls; ^bvalues for each assay tested; ^cvalues for each isotype tested (IgG and IgM)

Table 2. Characteristics of the studies on cytokines published in the last five years									
Authors	Cytokine tested	Design	Number of individuals		Sensitivity	Especificity	AUC	LR	Observations
			RA	Controls					
Goldbergova et al.	IL-15	Case-control	144	55	74.8%	70.4%	0.80	NR	Mean disease duration: 11 years
Takei et al.	IL-18Ra	Case-control	145	HS:67 DC:70	66.2%	87.6%	0.826	NR	Disease duration not reported
	IL-18				40.9%	83.5%	0.626	NR	
	IL-13				67.6%	82.5%	0.740	NR	
	IFN- γ				65.5%	62%	0.656	NR	
Goeb et al.	IL-7	Predictive	250	-	28%	83%	NR	NR	-
Silosi et al.	IL-13	Case-control	30	28	100%	100%	1.00	28	Patients with less than 1 year of disease
	IL-17				86,67%	100%	0.902	24.2	
Silosi et al.	IL-6	Case-control	30	28	100%	100%	1.00	14	Patients with less than 1 year of disease
	TNF- α				90%	100%	0.95	25.2	

RA: Rheumatoid Arthritis; AUC: Area Under the Curve for ROC analysis; LR: Likelihood Ratio; HS: Healthy Subjects; DC: Disease Controls; TNF: Tumor Necrosis Factor; IFN: Interferon; NR: Not Reported.

REFERENCES

- ALETAHA, D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 9, p. 1580-8, Sep 2010. ISSN 0003-4967.
- ALONSO, A. et al. Urine metabolome profiling of immune-mediated inflammatory diseases. **BMC Med**, v. 14, n. 1, p. 133, Sep 8 2016. ISSN 1741-7015.
- ARKEMA, E. V. et al. Monocyte chemotactic protein-1 elevation prior to the onset of rheumatoid arthritis among women. **Biomark Med**, v. 9, n. 8, p. 723-9, 2015. ISSN 1752-0363.
- ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 31, n. 3, p. 315-24, Mar 1988. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796>>.
- AZIZIEH, F. Y. et al. Patterns of circulatory and peripheral blood mononuclear cytokines in rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 37, n. 10, p. 1727-1734, Oct 2017. ISSN 0172-8172.
- BREKELMANS, M. P. et al. Smelling the Diagnosis: The Electronic Nose as Diagnostic Tool in Inflammatory Arthritis. A Case-Reference Study. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0151715, 2016. ISSN 1932-6203.
- BURSKA, A.; BOISSINOT, M.; PONCHEL, F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 545493, 2014. ISSN 1466-1861. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24733962>>.
- BUSZEWSKI, B. et al. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. **Biomed Chromatogr**, v. 21, n. 6, p. 553-66, Jun 2007. ISSN 0269-3879 (Print)0269-3879.
- CANTAGREL, A.; DEGBOE, Y. New autoantibodies associated with rheumatoid arthritis recognize posttranslationally modified self-proteins. **Joint Bone Spine**, v. 83, n. 1, p. 11-7, Jan 2016. ISSN 1297-319x.
- CHEN, J. et al. Serum progranulin unrelated with Breg cell levels, but elevated in RA patients, reflecting high disease activity. **Rheumatol Int**, v. 36, n. 3, p. 359-64, Mar 2016. ISSN 0172-8172.
- CONNOLLY, M. et al. Acute-phase serum amyloid A regulates tumor necrosis factor alpha and matrix turnover and predicts disease progression in patients with inflammatory arthritis before and after biologic therapy. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 4, p. 1035-45, Apr 2012. ISSN 0004-3591.
- CONTRERAS-YÁÑEZ, I.; PASCUAL-RAMOS, V. Window of opportunity to achieve major outcomes in early rheumatoid arthritis patients: how persistence with therapy matters. **Arthritis Res Ther**, v. 17, p. 177, Jul 2015. ISSN 1478-6362. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162892>>.

CORDERO, O. J. et al. Correction: CD26 Expression on T Helper Populations and sCD26 Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. In: (Ed.). **PLoS One**. United States, v.10, 2015. p.e0139535. ISBN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

_____. Anti-CD26 autoantibodies are involved in rheumatoid arthritis and show potential clinical interest. **Clin Biochem**, v. 50, n. 16-17, p. 903-910, Nov 2017. ISSN 0009-9120.

CROSS, M. et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. **Ann Rheum Dis**, v. 73, n. 7, p. 1316-22, Jul 2014. ISSN 0003-4967.

DEMIR, G. et al. Serum Adenosine Deaminase Level is High But Not Related with Disease Activity Parameters in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Open Rheumatol J**, v. 8, p. 24-8, 2014. ISSN 1874-3129 (Print)1874-3129.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 6, p. 313-26, Jun 2009. ISSN 1079-9907.

DIOGO, D. et al. Rare, low-frequency, and common variants in the protein-coding sequence of biological candidate genes from GWASs contribute to risk of rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet**, v. 92, n. 1, p. 15-27, Jan 10 2013. ISSN 0002-9297.

DU, J. et al. The association between the lymphocyte-monocyte ratio and disease activity in rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**, v. 36, n. 12, p. 2689-2695, Dec 2017. ISSN 0770-3198.

EMERY, P. et al. A European chart review study on early rheumatoid arthritis treatment patterns, clinical outcomes, and healthcare utilization. **Rheumatol Int**, v. 35, n. 11, p. 1837-49, Nov 2015. ISSN 0172-8172.

GAN, R. W. et al. Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. **J Rheumatol**, v. 42, n. 4, p. 572-9, Apr 2015. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

GOEB, V. et al. Progression to rheumatoid arthritis in early inflammatory arthritis is associated with low IL-7 serum levels. **Ann Rheum Dis**, v. 72, n. 6, p. 1032-6, Jun 2013. ISSN 0003-4967.

HARRIS, M. L. et al. Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 7, p. 1958-67, Jul 2008. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

HASSFELD, W. et al. Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 32, n. 12, p. 1515-20, Dec 1989. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

JOHANSSON, M. et al. PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 1, p. R19, 2006. ISSN 1478-6354.

KARLSON, E. W. et al. Association of environmental and genetic factors and gene-environment interactions with risk of developing rheumatoid arthritis. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 65, n. 7, p. 1147-56, Jul 2013. ISSN 2151-464x.

KITAS, G. D.; GABRIEL, S. E. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 1, p. 8-14, Jan 2011. ISSN 0003-4967.

KOKKONEN, H. et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 2, p. 383-91, Feb 2010. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112361>>.

KRENN, V. et al. 15 years of the histopathological synovitis score, further development and review: A diagnostic score for rheumatology and orthopaedics. **Pathol Res Pract**, v. 213, n. 8, p. 874-881, Aug 2017. ISSN 0344-0338.

KRIEGSMANN, M. et al. Expression of miR-146a, miR-155, and miR-223 in formalin-fixed paraffin-embedded synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Virchows Arch**, v. 469, n. 1, p. 93-100, Jul 2016. ISSN 0945-6317.

LAUWERYS, B. R. et al. Heterogeneity of synovial molecular patterns in patients with arthritis. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122104, 2015. ISSN 1932-6203.

LI, L. et al. Meta-Analysis: Diagnostic Accuracy of Anti-Carbamylated Protein Antibody for Rheumatoid Arthritis. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0159000, 2016. ISSN 1932-6203.

LI, Y. et al. Establishment of a decision tree model for diagnosis of early rheumatoid arthritis by proteomic fingerprinting. **Int J Rheum Dis**, v. 18, n. 8, p. 835-41, Nov 2015. ISSN 1756-1841.

LIAO, C. C. et al. Isotypes of autoantibodies against differentially expressed novel malondialdehyde-modified peptide adducts in serum of Taiwanese women with rheumatoid arthritis. **J Proteomics**, v. 170, p. 141-150, Jan 6 2018. ISSN 1874-3919.

LIU, F. et al. Role of Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA): A case-control study. **J Int Med Res**, v. 44, n. 4, p. 940-9, Aug 2016. ISSN 0300-0605.

LUBBERS, J. et al. The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 72, n. 5, p. 776-80, May 2013. ISSN 0003-4967.

MA, J. et al. [Value of serum matrix metalloproteinase-3 in the assessment of active disease in patients with rheumatoid arthritis]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 95, n. 47, p. 3823-8, Dec 15 2015. ISSN 0376-2491 (Print)0376-2491.

MADSEN, R. K. et al. Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 1, p. R19, Feb 8 2011. ISSN 1478-6354.

MAKSYMOWYCH, W. P. et al. Serum 14-3-3eta is a novel marker that complements current serological measurements to enhance detection of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 41, n. 11, p. 2104-13, Nov 2014. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

MARTINEZ, G. et al. Carbamylated vimentin represents a relevant autoantigen in Latin American (Cuban) rheumatoid arthritis patients. **Rheumatol Int**, v. 36, n. 6, p. 781-91, Jun 2016. ISSN 0172-8172.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 23, p. 2205-19, Dec 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22150039>>.

MCNALLY, E. et al. Diagnostic accuracy of a clinical prediction rule (CPR) for identifying patients with recent-onset undifferentiated arthritis who are at a high risk of developing rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Semin Arthritis Rheum**, v. 43, n. 4, p. 498-507, Feb 2014. ISSN 0049-0172.

MURATA, K. et al. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69118, 2013. ISSN 1932-6203.

NAGATA, Y. et al. Induction of apoptosis in the synovium of mice with autoantibody-mediated arthritis by the intraarticular injection of double-stranded MicroRNA-15a. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 9, p. 2677-83, Sep 2009. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

NISSIM, A. et al. Generation of neoantigenic epitopes after posttranslational modification of type II collagen by factors present within the inflamed joint. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 12, p. 3829-38, Dec 2005. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

NZEUSSEU TOUKAP, A. et al. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 5, p. 1579-88, May 2007. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

ORMSETH, M. J. et al. Utility of Select Plasma MicroRNA for Disease and Cardiovascular Risk Assessment in Patients with Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol**, v. 42, n. 10, p. 1746-1751, Oct 2015. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

PAVKOVA GOLDBERGOVA, M. et al. Circulating cytokine pattern and factors describing rheumatoid arthritis: IL-15 as one of the biomarkers for RA? **Biomarkers**, v. 17, n. 7, p. 655-62, Nov 2012. ISSN 1354-750x.

PECANI, A. et al. Erratum to: Prevalence, sensitivity and specificity of antibodies against carbamylated proteins in a monocentric cohort of patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune rheumatic diseases. In: (Ed.). **Arthritis Res Ther**. England, v.18, 2016a. p.299. ISBN 1478-6362 (Electronic)1478-6354 (Linking).

_____. Prevalence, sensitivity and specificity of antibodies against carbamylated proteins in a monocentric cohort of patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune rheumatic diseases. **Arthritis Res Ther**, v. 18, n. 1, p. 276, Nov 25 2016b. ISSN 1478-6354.

POTENCIANO, V. et al. A comparison of genomic profiles of complex diseases under different models. **BMC Med Genomics**, v. 9, p. 3, Jan 19 2016. ISSN 1755-8794.

PRIORI, R. et al. Metabolomics in rheumatic diseases: the potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 10, p. 1022-30, Aug 2013. ISSN 1568-9972.

REN, J.; SUN, L.; ZHAO, J. Meta-analysis: diagnostic accuracy of antibody against peptidylarginine deiminase 4 by ELISA for rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**, v. 36, n. 11, p. 2431-2438, Nov 2017. ISSN 0770-3198.

SEBASTIAN, A. et al. Glycan Biomarkers for Rheumatoid Arthritis and Its Remission Status in Han Chinese Patients. **Omics**, v. 20, n. 6, p. 343-51, Jun 2016. ISSN 1536-2310.

SEOK, A. et al. Identification and Validation of SAA4 as a Rheumatoid Arthritis Prescreening Marker by Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry. **Molecules**, v. 22, n. 5, May 14 2017. ISSN 1420-3049.

SHI, J. et al. The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 17, p. 339, Nov 24 2015. ISSN 1478-6354.

SILOSI, I. et al. Serum Biomarkers for Discrimination between Hepatitis C-Related Arthropathy and Early Rheumatoid Arthritis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, Jun 19 2017. ISSN 1422-0067.

_____. The Relationship of Cytokines IL-13 and IL-17 with Autoantibodies Profile in Early Rheumatoid Arthritis. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 3109135, 2016. ISSN 2314-7156.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023-2038, Oct 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156434>>.

STROLLO, R. et al. Autoantibodies to posttranslationally modified type II collagen as potential biomarkers for rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 7, p. 1702-12, Jul 2013. ISSN 0004-3591.

SUN, P. et al. Diagnostic value of autoantibodies combined detection for rheumatoid arthritis. **J Clin Lab Anal**, v. 31, n. 5, Sep 2017. ISSN 0887-8013.

SUROWIEC, I. et al. Metabolite and Lipid Profiling of Biobank Plasma Samples Collected Prior to Onset of Rheumatoid Arthritis. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0164196, 2016. ISSN 1932-6203.

SUZUKI, A.; YAMADA, R.; YAMAMOTO, K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1108, p. 323-39, Jun 2007. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923.

TAK, P. P. et al. Dominant B cell receptor clones in peripheral blood predict onset of arthritis in individuals at risk for rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 76, n. 11, p. 1924-1930, Nov 2017. ISSN 0003-4967.

TAKEI, S. et al. Soluble interleukin-18 receptor complex is a novel biomarker in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 2, p. R52, Mar 24 2011. ISSN 1478-6354.

TANG, W. et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. **Science**, v. 332, n. 6028, p. 478-84, Apr 22 2011. ISSN 0036-8075.

TSENG, S.; REDDI, A. H.; DI CESARE, P. E. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): A Biomarker of Arthritis. **Biomark Insights**, v. 4, p. 33-44, Feb 17 2009. ISSN 1177-2719 (Print)1177-2719.

VAN DER HELM-VAN MIL, A. H. et al. A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 2, p. 433-40, Feb 2007. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

VASANTHI, P.; NALINI, G.; RAJASEKHAR, G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Int J Rheum Dis**, v. 12, n. 1, p. 29-33, Apr 2009. ISSN 1756-1841.

VERHEUL, M. K. et al. Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. **Clin Immunol**, v. 161, n. 1, p. 2-10, Nov 2015. ISSN 1521-6616.

VINAPAMULA, K. S. et al. Serum Adenosine Deaminase as Inflammatory Marker in Rheumatoid Arthritis. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 9, p. Bc08-10, Sep 2015. ISSN 2249-782X (Print)0973-709x.

WOETZEL, D. et al. Identification of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients by transcriptome-based rule set generation. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 2, p. R84, Apr 1 2014. ISSN 1478-6354.

YANG, X. et al. Diagnostic accuracy of anti-RA33 antibody for rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 34, n. 3, p. 539-47, May-Jun 2016. ISSN 0392-856X (Print)0392-856x.

YE, Y. et al. Judging disease activity in rheumatoid arthritis by serum free kappa and lambda light chain levels. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 29, n. 10, p. 547-53, Oct 2013. ISSN 1607-551X (Print)1607-551x.

ZABEK, A. et al. Application of (1)H NMR-based serum metabolomic studies for monitoring female patients with rheumatoid arthritis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 117, p. 544-50, Jan 5 2016. ISSN 0731-7085.

ZHANG, X. L. Roles of glycans and glycopeptides in immune system and immune-related diseases. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 10, p. 1141-7, 2006. ISSN 0929-8673 (Print)0929-8673.

42 ARTIGO 2: SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF INTERLEUKIN 29 IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND OTHER RHEUMATIC DISEASES

A Interleucina-29 (IL-29) tem sido descrita na literatura como um biomarcador da Artrite Reumatoide (AR). Estudos mostram que a IL-29 pode exercer efeito imunorregulador na patogênese da AR, inibindo a resposta de Th2 (do inglês, *T helper 2*), e modulando as respostas de Th1 (do inglês, *T helper 1*) e Th2, subgrupos de linfócitos T CD4+. Achados prévios demonstram que os níveis séricos de IL-29 são aumentados em pacientes com AR comparados com indivíduos saudáveis. Este trabalho teve por objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade da IL-29 em distinguir pacientes com AR de pacientes com outras doenças reumáticas (não AR) e controles saudáveis.

Os níveis séricos de IL-29 foram mensurados em 121 pacientes com AR recrutados do Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Variáveis clínicas, radiológicas e laboratoriais foram analisadas. Além de pacientes com AR, 192 indivíduos com outras doenças reumáticas e 68 indivíduos saudáveis, que não apresentavam nenhuma doença reumática e não estavam em uso de nenhum medicamento nas últimas duas semanas, foram incluídos neste estudo.

Níveis de IL-29 encontram-se aumentados em pacientes com AR, 113.6 pg/ml (IQR=31.25-308.5), comparados com os controles saudáveis, 31.25pg/ml $p < 0.0001$. Na comparação entre AR e pacientes com Esclerose Sistêmica (ES), Osteoartrite (OA) e Fibromialgia (FM) os níveis medianos encontrados também foram de 31,25pg/ml. Já os pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), apresentaram níveis de 31.25 (IQR=31.25-57.04)pg/ml e $p = 0.0001$.

Os valores de corte de IL-29 para distinguir pacientes com AR de pacientes não-AR foram 61,11 pg/ml (sensibilidade 57,02%, especificidade 92,71%, LR: 7,82) e para todos os indivíduos foi de 32,96 pg / ml (sensibilidade 64,46%, especificidade 87,31%, LR: 5.08). Além disso, a IL-29 correlacionou-se negativamente com a idade ($r = -0.189$, $p = 0.0382$) e a duração da doença ($r = -0.192$, $p = 0.0370$). Adicionalmente, a IL-29 correlacionou-se positivamente com a contagem de neutrófilos em pacientes com AR que tem níveis séricos presentes do fator reumatoide ($r = 0.259$, $p = 0.0221$).

Nossos resultados sugerem que a IL-29 pode ser um biomarcador nas doenças autoimunes, especialmente na AR, e que os níveis séricos de IL-29 podem ser usados como um marcador de diagnóstico biológico na AR. Este é o primeiro estudo a demonstrar a capacidade da IL-29 para a diferenciação entre pacientes com AR e indivíduos com outras doenças reumáticas. Esses achados sugerem que medir os níveis de IL-29 pode ser uma ferramenta útil para avaliar a presença de AR.

Sensitivity and specificity of Interleukin 29 in patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases

Laurindo Ferreira da Rocha Junior, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, Adson Belem Ferreira da Paixão, Kamila de Melo Vilar, Hugo Deleon de Lima, Andrea Tavares Dantas, Henrique de Ataíde Mariz, Ivan da Rocha Pitta, Maira Galdino da Rocha Pitta
From the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil.

Supported by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-IF) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

L.F. Rocha Jr, PhD Student, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas and Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

A.L.B.P. Duarte, PhD, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

M.J.B.M. Rêgo, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE;

A. B. F. Paixão., Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE;

K. M. Villar, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE;

H.D.Lima, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE;

A.T. Dantas, MS, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

H.A. Mariz, MS, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

I.R. Pitta, PhD, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE;
M.G.R. Pitta, PhD, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens
Terapêuticas da UFPE.

Address correspondence to Dr. M.G.R. Pitta, UFPE, Centro de Ciências
Biológicas, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade
Universitária, Recife – PE, 50670-901, Brazil. E-mail: mgrpitta@gmail.com

Running title: Rocha Jr, et al: IL-29 identifies RA from non-RA individuals.

Key messages

Interleukin 29 is a cytokine that might be useful in identifying patients with Rheumatoid arthritis among other rheumatic diseases and healthy individuals. The investigation of interleukin 29 in RA demonstrated this cytokine may be a biomarker in disease.

This paper seeks to describe accuracy of IL-29 in distinguishing RA among other rheumatic diseases, and highlight the need for further studies in the future.

ABSTRACT

Background. IL-29 has been identified in rheumatoid arthritis (RA) and reported as a biomarker of the disease.

Objective. To analyse the accuracy of IL-29 in RA among normal subjects and patients with other rheumatic diseases.

Methods. IL-29 serum levels were measured in 121 patients with RA, 53 patients with systemic lupus erythematosus, 60 patients with systemic sclerosis, 29 patients with fibromyalgia, 50 patients with osteoarthritis and 68 healthy individuals as controls. IL-29 levels in serum was investigated by ELISA. Sensitivity, specificity and likelihood ratios (LR) for having RA were calculated.

Results. IL-29 median levels were increased in RA patients 113.6 (IQR=31.25-308.5) pg/ml compared with non-RA patients 31.25 pg/ml and healthy controls 31.25 pg/ml, $p < 0.0001$. The IL-29 cut-off values to distinguish patients with RA from non-RA patients was 61.11 pg/ml (sensitivity 57.02, specificity 92.71, LR: 7.82) and for all the subjects was 32.96 pg/ml (sensitivity 64.46, specificity 87.31, LR: 5.08). Additionally, IL-29 correlated negatively with age ($r = -0.189$,

$p=0.0382$) and disease duration (-0.192 , $p=0.0370$). Interestingly, IL-29 correlated with neutrophil count in RA patients positive for rheumatoid factor ($r=0.259$, $p=0.0221$).

Conclusion. Serum IL-29 is higher in serum of patients with RA compared to non-RA subjects and might be used as potential biological marker.

Key Indexing Terms. Accuracy, diagnosis, interleukin.

Introduction

RA is a chronic systemic autoimmune disease characterized by synovial inflammation and, sometimes, with extra-articular features. Cytokines play a pivotal role in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA) and are directly implicated in many processes that are associated with the pathogenesis of these diseases⁽¹⁾. Cytokines are involved within a complex regulatory network related to specific immunological processes that promote autoimmunity, chronic inflammation and tissue damage⁽²⁾.

The interferon (IFN) family cytokines are involved in both innate and adaptive immune responses associated with viral infection and autoimmune inflammation⁽³⁾. The IFN- λ family also antiproliferative and antitumoral activities^{(4),(5)}. The type III IFN cytokines consists of IL-29 (IFN- $\lambda 1$), IL-28A (IFN- $\lambda 2$) and IL-28B (IFN- $\lambda 3$). The IFN- λ family expression is induced in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) upon stimulation with poly (I:C) or lipopolysaccharide (LPS) and/or viral infection^{(6),(7)}. The receptor complex for IFN- λ consists of IL-28RA and IL-10R2^{(8),(9)}. The downstream signaling of type III interferons is regulated through Janus kinase/signal transducers and activators of transcription signal transduction resulting in the induction of interferon-stimulated response elements and initiation of gene transcription⁽⁸⁾.

IL-29 has shown potential immunoregulatory function as this cytokine inhibits human Th2 responses and has modulatory activity in Th1/Th2 response^{(10),(11)}. Human macrophages and monocytes exposed to IL-29 produced IL-6, IL-8 and IL-10⁽¹²⁾. The modifying effect of IL-29 on TLR4-mediated inflammation may contribute to RA pathogenesis as TLR4 is

important to pathogen recognition and activation of the innate immune system⁽¹³⁾.

Serum levels of IL-29 were significantly higher in RA patients compared to healthy controls⁽¹⁴⁾. Treatment with disease modifying antirheumatic drugs declined IL-29 serum levels of RA patients, particularly those with anti-CCP antibodies and was also associated with a decrease in DAS28⁽¹⁴⁾. Taken together, all these findings suggest that IL-29 may play a role in inflammation associated with RA.

RA chronicity leads to severe pain and impaired activity⁽¹⁵⁾. The typical presentation of RA is tender and swollen joints and morning joint stiffness. Therefore, this presentation is not specific to RA and other causes of arthritis need to be considered⁽¹⁶⁾. Thus, diagnosis and differentiation of RA from other types of arthritis and autoimmune diseases are very important issues for treating patients specifically according to the underlying disease. Currently, the diagnosis of RA is mainly based on clinical symptoms, imaging results and laboratory tests such as acute phase reactants (erythrocyte sedimentation rate - ESR and C-reactive protein - CRP) and presence of antibodies (rheumatoid factor – RF and cyclic citrullinated peptide – anti-CCP)⁽¹⁶⁾. If we can differentiate RA patients from non-RA in individuals with musculoskeletal complaints it could be valuable for initiating specific treatment, avoiding unnecessary approaches and controlling progression of disease. Accordingly, research has focused on identifying biomarkers and specific tests for detecting RA, particularly in early stages⁽¹⁷⁾. Thus, new diagnostic biomarkers are still important in RA⁽¹⁸⁾. Cytokines have shown to be biomarkers in RA and may aid in differential diagnosis and provide additional benefit in classification of RA subtypes^{(18),(19)}.

Based on the novel findings of IL-29 in RA and on the importance of diagnosing RA promptly, the aim of this study was to evaluate the accuracy of IL-29 in RA compared to other rheumatic diseases and to healthy individuals.

Patients and methods

Study Population

A total of 121 patients with RA (11 males, 110 females; Mean age 52.9, range 22-79) were recruited from the Department of Rheumatology at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Current medications were recorded (Table 1). No patients were under biological drugs. The diagnosis of RA was established by the presence of four or more American College of Rheumatology (ACR) 1987 diagnostic criteria⁽²⁰⁾. Individuals with other rheumatologic diseases included were 60 patients with Systemic Sclerosis (SSc), 53 patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE), 50 patients with Osteoarthritis (OA) and 29 patients with Fibromyalgia (FM). All the patients with SLE, SSc, OA and FM met the American College of Rheumatology criteria for each disease^{(21),(22),(23),(24),(25),(26)}. Patients with overlap syndromes were excluded. About 68 normal healthy subjects (NHS) were included as controls, all of them did not have any rheumatologic conditions and were not taking any medications for the last two weeks. Non-RA patients and healthy controls were not matched by gender or age with RA group. Peripheral blood samples were obtained from patients and healthy volunteers. Informed consent was obtained from all study participants.

Demographic, clinical and laboratory data were collected from hospital records or by questionnaire and reviewed by experienced physicians. Table 1 presents demographic and clinical findings in patients with RA.

Laboratory features of RA patients such as erythrocyte sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor (RF) positivity and blood cell count were recorded. Individual disease activity was quantified using the disease activity score (DAS28)⁽²⁷⁾ and the Clinical Activity Index (CDAI)⁽²⁸⁾. Functional capacity was evaluated by Health Assessment Questionnaire-Disability Index (HAQ-DI)⁽²⁹⁾. Radiographs of hands were obtained from 103 RA patients and evaluated for the presence of erosions by an experienced rheumatologist blinded to the clinical data. The study was approved by the ethics committee of the UFPE (PROTOCOL 1.486.537).

Measurement of serum IL-29 levels

Cytokines in sera were assayed with an ELISA kit according to the manufacturer's recommendation (R&D Systems). The lower limit of detection for ELISA IL-29 kit was 31.25pg/ml. All assays were performed in duplicate.

Statistical analysis

Results were presented as median and interquartile interval. Associations of serum IL-29 levels with clinical and laboratory parameters of the patients were analyzed by univariate comparisons using Mann-Whitney test for non-parametric data and Student's *t*-test for parametric data. Correlation between the clinical and laboratory characteristics and serum IL-29 were analyzed using Spearman rank correlation test for non-normal distribution and Pearson's correlation test for normal distributions. Correlations of < 0.40, 0.40–0.60 and > 0.60 were defined as weak, moderate and strong, respectively.

Optimum cut-off values were calculated to optimize sensitivity and specificity (i.e. the Young Index). Receiver-operating characteristic (ROC) were plotted (sensitivity against 100-specificity) and the areas under the ROC curves were calculated to assess the performance of IL-29 to distinguish RA from other rheumatic diseases and from healthy controls.

P values < 0.05 were considered statistically significant. All tests were two-tailed. All quantitative data were plotted with Graph Pad Prism 6.01 software and MedCalc 17.4.4.

Results

Serum IL-29 levels in patients with RA and controls

In total, 121 patients with RA, 192 non-RA patients and 68 healthy controls were included in our analysis. Serum median IL-29 levels were significantly increased in RA patients 113.6 pg/ml (IQR=31.25-308.5) compared with SSc median 31.25pg/ml, OA patients median 31.25 pg/ml, FM patients median 31.25 pg/ml and healthy controls median 31.25pg/ml, *p* < 0.001 for all of them. Median levels of RA patients were also increased compared to SLE patients 31.25 (IQR=31.25-57.04)pg/ml, *p*=0.0001 (Figure 1). When RA serum

levels (median 113.6) were compared to all the subjects studied (median 31.25pg/ml) and with non-RA patients (median 31.25 pg/ml) the analysis was also significant ($p < 0.0001$). Patients with SSc, OA, FM and healthy controls had serum IL-29 median levels under the lower limit of detection in the analysis. Five out of 60 SSc patients had higher IL-29 serum levels above the lower limit of detection in the analysis.

Serum IL-29 correlations and associations with clinical parameters in RA patients

To assess associations between serum IL-29 and clinical manifestations, we compared serum IL-29 among patients with and without certain features as active disease (according to DAS28 and CDAI), functional capacity (HAQ >1). We identified that no significant differences were found as well as for laboratory parameters such as high ESR ($>30\text{mm/h}$) and presence or absence of rheumatoid factor (data not shown). There was no association of IL-29 levels with use of any disease modifying rheumatic drugs and with radiographic erosions.

There was a weak negative correlation of IL-29 levels in RA patients with age ($r = -0.189$, $p = 0.038$) and with disease duration ($r = -0.192$, $p = 0.037$) but not with the other clinical parameters examined (Table 2).

Correlation of serum IL-29 and neutrophils count in patients regarding presence of rheumatoid factor

We then correlated the levels of IL-29 and laboratory data. Ninety patients who underwent blood cell count were divided into two groups according to presence ($n = 78$) or absence of rheumatoid factor ($n = 12$). We found a weak positive correlation between IL-29 serum levels and absolute neutrophils count in patients with positive rheumatoid factor ($r = 0.259$, $p = 0.0221$). On the other hand, there was a strong negative correlation of IL-29 serum levels and absolute neutrophils count in patients negative for rheumatoid factor ($r = -0.6681$, $P = 0.082$). (FIGURE 2)

Sensitivity and specificity of serum IL-29 to distinguish RA from no-RA patients and healthy controls

Next, we investigated the sensibility and specificity of IL-29 in distinguishing RA from other rheumatic diseases and from healthy controls. The discriminatory ability of serum IL-29 in differentiating patients with RA from non-RA patients and from healthy controls as well as optimal cut off values of IL-29 are summarized in Table 3.

The AUC from ROC analysis was 0.672 (CI 0.597-0.742) for IL-29 in distinguishing RA from SLE, 0.793 (CI 0.727-0.850) from SSc, 0.810 (CI 0.743-0.866) from OA, 0.826 (CI 0.756-0.883) from FM and 0.810 (CI 0.747-0.864) from healthy controls. Whereas when taken together all non-RA patients, the AUC from ROC analysis was 0.769 (CI 0.719-0.815). Meanwhile the performance of serum IL-29 in RA versus all the subjects of the study demonstrated an AUC from ROC analysis of 0.780 (CI 0.735-0.821) (FIGURE 3). When using the IL-29 cut-off of 32.96pg/ml to identify RA in all the subjects analyzed, the percentage of correctly classified patients was 64.46% (sensitivity) and the percentage correctly classified as not having RA was 87.31% (specificity).

Discussion

In our study, IL-29 levels were increased in patients with RA compared with those of non-RA patients and healthy controls. In this series, levels of IL-29 correlated negatively with age and disease duration. Of note, when RA patients were divided into RF-positive and RF-negative groups, there were differences in the correlation of absolute neutrophils count with IL-29 levels. Interestingly, RF-positive patients had a positive correlation of IL-29 and absolute neutrophil count whereas RF-negative patients had a negative correlation of IL-29 and absolute neutrophil count. The validity of IL-29 in distinguishing RA from other rheumatic diseases and healthy controls showed that IL-29 has moderate sensitivity and high specificity in identifying RA.

As already mentioned, the present study found that IL-29 was higher in RA compared to disease controls and healthy subjects. Although in our study

IL-29 serum levels were higher in RA than SLE patients, levels of this cytokine in SLE patients are higher than healthy controls (data not shown). This is in accordance with a previous study in which IL-29 mRNA and protein levels were elevated when compared to healthy subjects, particularly in active SLE. This study demonstrated that serum IL-29 correlated positively with anti-ds DNA antibody and CRP and high levels were associated with renal disease and arthritis⁽³⁰⁾. Additionally, enhanced IL-29 could be measured in the serum of cutaneous lupus erythematosus patients with active skin lesions⁽³¹⁾. In SSc, a recent study of our group reported that IL-29 was elevated compared to healthy individuals and this cytokine had a positive correlation with IFN- γ levels (32). In OA, previous works also investigated IL-29. IL-29 mRNA and its receptor IL-28Ra were significantly higher in PBMCs of OA patients compared to healthy controls and were also elevated in OA synovial tissue⁽³³⁾. This finding was also reported in RA patients⁽³⁴⁾. IL-29 was strongly expressed in macrophages and fibroblasts of OA synovium, up regulated expression of IL-1 β , IL-6, IL-8 and MMP-3 mRNA and was associated with cartilage degradation⁽³³⁾. Therefore this cytokine might contribute to OA pathogenesis. Nevertheless, elevated levels of IL-29 were found in synovial fluid of RA patients compared to osteoarthritis patients⁽³⁵⁾.

The high levels of serum IL-29 in RA patients compared to healthy controls are in agreement with previous studies by Wang et al and Quiong-jie Chang^{(35),(14)}. However, we did not find any association between IL-29 levels and clinical characteristics such as HAQ, ESR and DAS28 in contrast to previous findings in anti-CCP positive RA patients⁽¹⁹⁾. On the other hand, Wang et al found no correlation between IL-29 protein or serum levels and DAS28, CRP, ESR, RF and anti-CCP⁽¹⁶⁾. Given the controversial data on the association of IL-29 with clinical and laboratory parameters, studies with larger sample size are necessary.

The second novel finding of this study is that IL-29 levels correlated negatively with age and disease duration. Since the early event in the disease progression is the breakdown of self-tolerance in immune responses with enhanced antibody production, higher levels of IL-29 in younger patients and with shorter time of diagnosis would be an explanation for this negative correlation⁽³⁶⁾. Another possible explanation for this correlation is that

modifications of the immune responses as a form of deterioration of the immune system related to aging (immunosenescence) might be associated with the results found⁽¹⁹⁾.

Another interesting finding is that we found a positive and negative correlation of IL-29 with absolute neutrophil count in patients RF-positive and RF-negative, respectively. Since RF-positive patients tend to have more severe disease it is important to note that they may have greater inflammatory burden. Induction of the proinflammatory proteins IL-6 and L-8 by IL-29 was previously reported and these cytokines are important chemoattractant for neutrophils^{(34),(37)}.

In addition, this present study is the first to demonstrate the optimal cut-off value of IL-29 (61.11pg/ml) for discriminating patients with RA from patients with other rheumatic diseases. Interleukin-29 demonstrated low sensitivity (57.02% CI 47.7-66.0) and high specificity (92.71%, CI 88.1-96.0) for discriminating patients with RA and patients with other rheumatic diseases. A robust meta-analysis demonstrated the pooled sensitivity and specificity for IgM RF as 69% (CI, 65% to 73%) and 85% (CI, 82% to 88%), respectively⁽³⁸⁾. As for ACPA, a systematic review estimated test performance characteristics of anti-CCP antibody and included 151 studies with considerable heterogeneity in sensitivity (12% to 93%) and specificity (63% a 100%). When the analysis was restricted to 8 cohort studies of early rheumatoid arthritis that assessed both anti-CCP2 (a newer generation assay of ACPA) and rheumatoid factor, sensitivity of rheumatoid factor and anti-CCP2 were almost identical (56% vs. 58%), however specificity was considerably higher for anti-CCP2 than for rheumatoid factor (96% vs. 86%)⁽³⁹⁾. Taken RF and ACPA together (both markers positive) in the diagnosis of RA, the pooled sensitivity was 57% (CI, 55% to 59%) and specificity was 96% (CI, 96% to 97%)⁽⁴⁰⁾. It is tempting to speculate that the combination of IL-29 and antibodies (rheumatoid factor or anti-CCP) would be an additional useful tool for diagnosis.

Therefore, it should be noted that IL-29 levels can be influenced by disease modifying antirheumatic drugs and corticosteroids use which is a limitation of the present study. Although, when we stratified patients according to current treatment, there was no difference between IL-29 serum levels (data not shown). Of note, we did not investigate the presence of anti-CCP antibodies

as it is suggested that these antibodies are associated with higher levels of IL-29⁽¹⁴⁾. However, serum levels of IL-29 between rheumatoid factor positive and rheumatoid factor negative patients were not different (data not shown), where as opposite results was reported by Chang et al⁽¹⁴⁾. Nevertheless, our study has a larger sample size. Furthermore, the patients in the present study had RA with a relatively long duration (mean 8.9 years) and a population of RA patients with early diagnosis should be more appropriate. Although when we divided the patients in two groups according to disease duration (less and more than 2 years) there was not statistical difference between IL-29 serum levels (data not shown).

Considering that part of RA patients may experiment inadequate responses to current disease modifying rheumatic drugs it is still a demanding challenge to identify key cytokines involved in RA pathogenesis⁽⁴¹⁾. Based on the above findings, the present study demonstrated that IL-29 could be a useful laboratory marker for discriminating between patients with RA and patients with other rheumatic diseases as well as patients with RA and healthy individuals.

In conclusion, this was the first study to demonstrate higher levels of IL-29 in rheumatoid arthritis among patients with other rheumatic diseases and its accuracy in distinguishing RA patients among individuals with diseases that may present joint complaints.

CONCLUSIONS

Our results suggest that IL-29 may be a biomarker in autoimmune diseases specially in RA and that serum IL-29 levels might be used as a biological diagnostic marker in RA. To our knowledge, this is the first study to demonstrate the ability of IL-29 for differentiating between patients with RA and individuals with other rheumatic diseases. These findings suggest that measuring IL-29 levels may be a helpful tool for assessing the presence of RA. Further studies are necessary to elucidate the potential of IL-29 diagnostic performance in RA, especially with patients in early phases of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-IF) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

DECLARATION OF CONFLICTING INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205-19.
2. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):429-42.
3. González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):125-35.
4. Witte K, Witte E, Sabat R, Wolk K. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(4):237-51.
5. Li M, Liu X, Zhou Y, Su SB. Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol*. 2009;86(1):23-32.
6. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:71-109.
7. Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld JC. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem*. 2004;279(31):32269-74.
8. de Groen RA, Liu BS, Boonstra A. Understanding IFN λ in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):102.
9. Yoon SI, Jones BC, Logsdon NJ, Harris BD, Deshpande A, Radaeva S, et al. Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Structure*. 2010;18(5):638-48.
10. Jordan WJ, Eskdale J, Srinivas S, Pekarek V, Kelner D, Rodia M, et al. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. *Genes Immun*. 2007;8(3):254-61.
11. Srinivas S, Dai J, Eskdale J, Gallagher GE, Megjugorac NJ, Gallagher G. Interferon-lambda1 (interleukin-29) preferentially down-regulates interleukin-13 over other T helper type 2 cytokine responses in vitro. *Immunology*. 2008;125(4):492-502.
12. Jordan WJ, Eskdale J, Boniotto M, Rodia M, Kellner D, Gallagher G. Modulation of the human cytokine response by interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29). *Genes Immun*. 2007;8(1):13-20.
13. Xu D, Yan S, Wang H, Gu B, Sun K, Yang X, et al. IL-29 Enhances LPS/TLR4-Mediated Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(1):27-34.
14. Chang QJ, Lv C, Zhao F, Xu TS, Li P. Elevated Serum Levels of Interleukin-29 Are Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients with Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies. *Tohoku J Exp Med*. 2017;241(2):89-95.
15. Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med*. 2007;120(11):936-9.

16. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023-38.
17. Contreras-Yáñez I, Pascual-Ramos V. Window of opportunity to achieve major outcomes in early rheumatoid arthritis patients: how persistence with therapy matters. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:177.
18. Trouw LA, Mahler M. Closing the serological gap: promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):318-22.
19. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:545493.
20. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31(3):315-24.
21. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum*. 1980;23(5):581-90.
22. Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum*. 1990;33(11):1601-10.
23. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum*. 1986;29(8):1039-49.
24. Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum*. 1991;34(5):505-14.
25. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum*. 1990;33(2):160-72.
26. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1725.
27. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38(1):44-8.
28. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R796-806.

29. Fries JF, Spitz PW, Young DY. The dimensions of health outcomes: the health assessment questionnaire, disability and pain scales. *J Rheumatol*. 1982;9(5):789-93.
30. Wu Q, Yang Q, Lourenco E, Sun H, Zhang Y. Interferon-lambda1 induces peripheral blood mononuclear cell-derived chemokines secretion in patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(3):R88.
31. Zahn S, Rehkämper C, Kümmerer BM, Ferring-Schmidt S, Bieber T, Tüting T, et al. Evidence for a pathophysiological role of keratinocyte-derived type III interferon (IFN λ) in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol*. 2011;131(1):133-40.
32. Dantas AT, Gonçalves SM, Pereira MC, de Almeida AR, Marques CD, Rego MJ, et al. Interferons and systemic sclerosis: correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29). *Autoimmunity*. 2015;48(7):429-33.
33. Xu L, Peng Q, Xuan W, Feng X, Kong X, Zhang M, et al. Interleukin-29 Enhances Synovial Inflammation and Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:9631510.
34. Xu L, Feng X, Tan W, Gu W, Guo D, Zhang M, et al. IL-29 enhances Toll-like receptor-mediated IL-6 and IL-8 production by the synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R170.
35. Wang F, Xu L, Feng X, Guo D, Tan W, Zhang M. Interleukin-29 modulates proinflammatory cytokine production in synovial inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R228.
36. Abramson J, Husebye ES. Autoimmune regulator and self-tolerance - molecular and clinical aspects. *Immunol Rev*. 2016;271(1):127-40.
37. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*. 2003;24(1):25-9.
38. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2007;146(11):797-808.
39. Whiting PF, Smidt N, Sterne JA, Harbord R, Burton A, Burke M, et al. Systematic review: accuracy of anti-citrullinated Peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2010;152(7):456-64; w155-66.
40. Sun J, Zhang Y, Liu L, Liu G. Diagnostic accuracy of combined tests of anti cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(1):11-21.
41. Siebert S, Tsoukas A, Robertson J, McInnes I. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Pharmacol Rev*. 2015;67(2):280-309.

Table I. Demographic, clinical, and laboratory presentation of the patients with rheumatoid arthritis (RA).

Characteristic	
No. Patients	121
Age (years) (range)	
Mean	52.9
Range	22 – 79
Gender	
Female	110
Male	11
Disease duration (years)	
Mean	8.9
Range	0.1 – 45.4
Rheumatoid factor (%)	
Positive	97 (86.2)
Negative	24 (13.8)
Radiological erosions (%)	
	n = 103 (100)
Present	56 (54.4)
Absent	47 (45.6)
Treatment (%)	
Steroids	92 (76.1)
Methotrexate	76 (62.8)
Leflunomide	32 (26.4)
Antimalarial agents	11 (9.1)
Biological drugs	-
Disease activity (%)	
Disease Activity Score 28 joints (DAS 28)	
Clinical remission	9 (7.4)
Mild disease	11 (9.1)
Moderate disease	48 (39.6)
Severe disease	53 (43.8)
Clinical Disease Activity Index (CDAI)	
Clinical remission	9 (7.4)
Mild disease	24 (19.8)
Moderate disease	39 (32.2)
Severe Disease	49 (40.6)

Table II. Correlations between IL-29 levels and clinical and laboratory characteristics in RA patients.

Parameter	Correlation coefficient (r)	p-value
Age*	-0.189	0.0382
Disease duration*	-0.192	0.0370
Tender joints	0.16	0.08
Swollen joints	-0.042	0.648
Doctor VAS¹	-0.060	0.512
Patients VAS	0.001	0.994
Pain VAS	0.114	0.241
CDAI²	0.069	0.453
DAS28³	0.069	0.45
HAQ⁴	0.073	0.472
ESR⁵	-0.04208	0.6482

1. VAS – visual analogue scale; 2. CDAI – clinical disease activity index;
 3. DAS28 – disease activity score in 28 joints; 4. HAQ – health assessment questionnaire; 5. ESR – erythrocyte sedimentation rate; *p < 0.05.

Table III. Accuracy of serum IL-29 in distinguishing RA patients from non-RA patients and healthy controls

	Subjects tested	Optimal cut-off values (pg/ml)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	LR
SLE	53	61.11	57.02 (47.7 – 66.0)	83.02 (72.2 – 91.9)	3.36
SSc	60	31.25	65.29 (56.1 – 73.7)	91.67 (82.6 – 97.2)	7.83
OA	50	31.25	65.29 (56.1 - 73.7)	96.00 (86,3 – 99.5)	16,32
FM	29	31.25	65.29 (56.1 – 73.7)	100.0 (88.1 – 100.0)	–
NON-RA	192	61.11	57.02 (47.7 - 66,0)	92.71 (88.1 – 96.0)	7.82
NHS	68	31,25	65.29 (56.1 – 73.7)	95.59 (87.6 – 99.1)	14.80
Overall	260	32.96	64.46 (55.2 – 73.0)	87.31 (82.6 – 91.1)	5.08

LR: likelihood ratio

Figure 1. Levels of IL-29 in serum of rheumatoid arthritis patients (RA), patients with other rheumatic diseases (non-RA) and normal healthy controls (NHS). **p<0.0001 for RA vs Systemic Sclerosis (SSc), Fibromyalgia (FM), Osteoarthritis (OA), NHS, non-RA patients and overall; ***p=0.0001 for RA vs Systemic Lupus Erythematosus (SLE).**

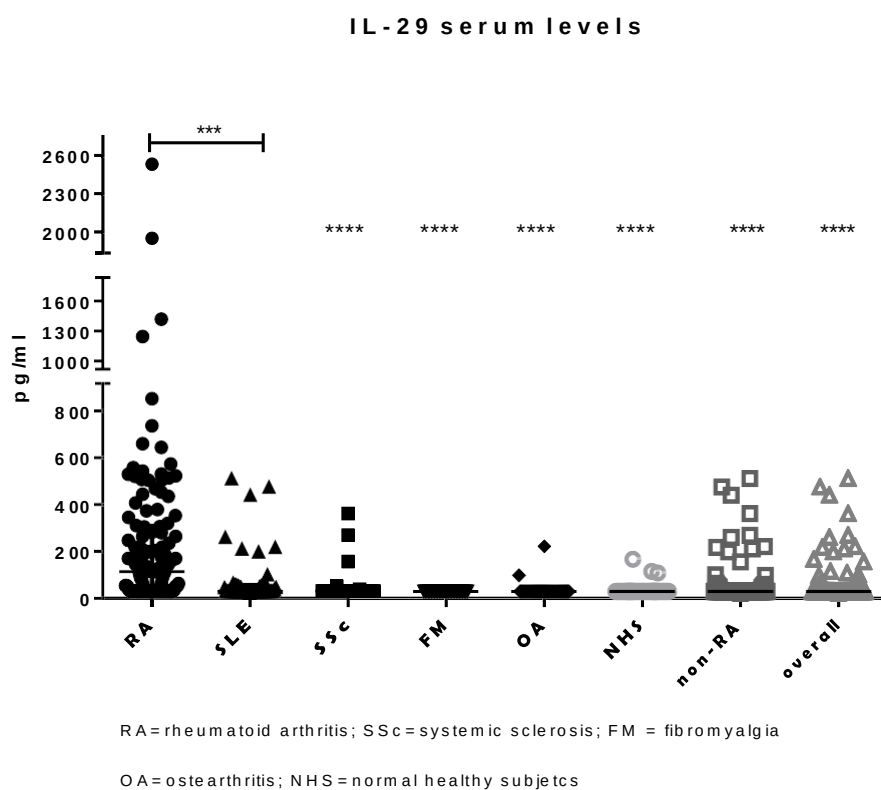


Figure 2. Correlation between serum interleukin 29 levels from RA patients (n=90) and absolut neutrophil counts in patients positive for rheumatoid factor (A) and negative for rheumatoid factor (B).

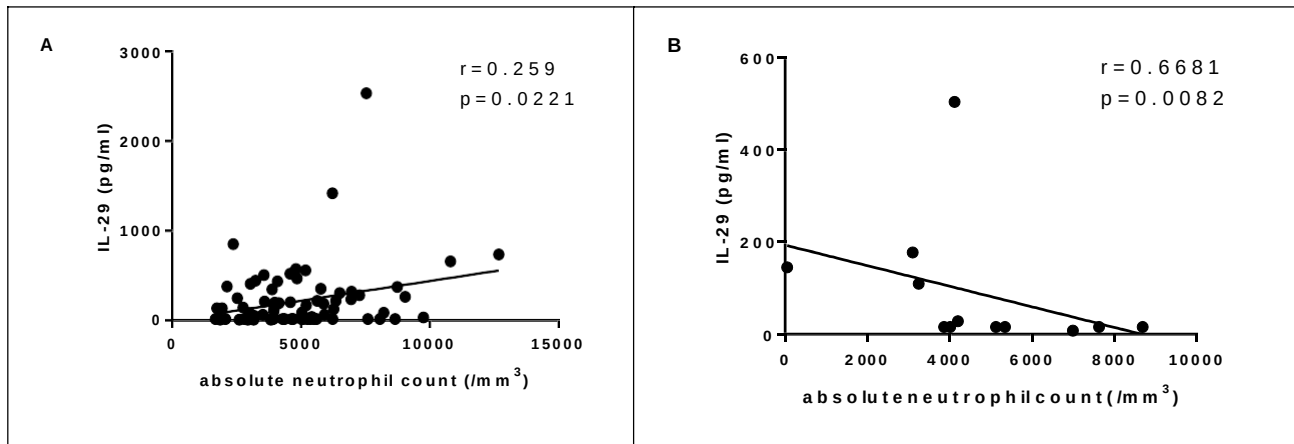
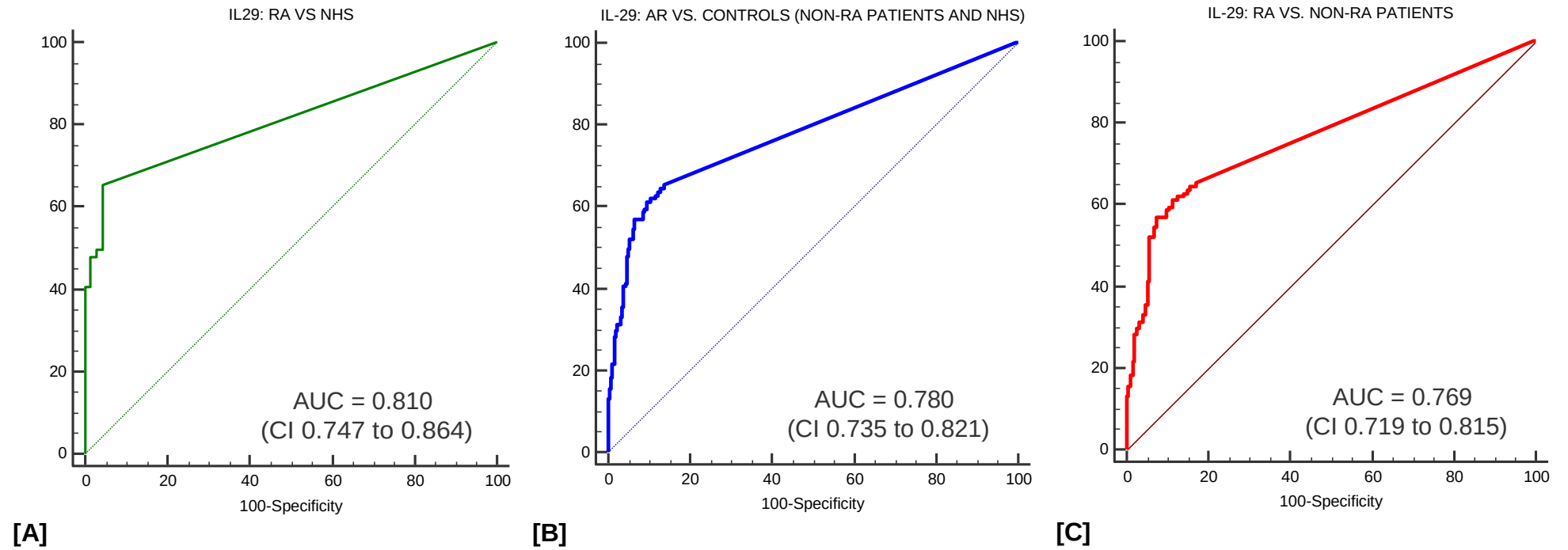


Figure 3. Receiver operating characteristic (ROC) curve for IL-29 validity for distinguishing RA. (RA – rheumatoid arthritis, NHS- normal healthy subjects).



4.3 ARTIGO 3: SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF INTERLEUKIN 22 IN RHEUMATOID ARTHRITIS

A Interleucina-22 (IL-22) tem sido descrita na literatura como uma das citocinas que desempenham importante papel inflamatório em doenças autoimunes, como a Artrite Reumatoide (AR). Os achados revelam que os níveis séricos de IL-22 são maiores em pacientes com AR comparados a indivíduos saudáveis, e esse aumento está associado a um pior quando clínico. Este artigo teve como objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade da IL-22 na distinção de AR entre indivíduos saudáveis e pacientes com outras doenças reumáticas (não-AR).

Os níveis séricos de IL-22 foram mensurados em 135 pacientes com AR, recrutados do Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Variáveis clínicas, radiológicas e laboratoriais foram analisadas e registradas em prontuário. Além de pacientes com AR, 211 indivíduos com outras doenças reumáticas e 68 indivíduos saudáveis, que não apresentavam nenhuma doença reumática e não estavam em uso de nenhum medicamento nas últimas duas semanas, foram incluídos neste estudo. Foram calculadas sensibilidade, especificidade, razões de verossimilhança e área sob a curva (AUC) para os níveis de IL-22 na identificação de pacientes com AR na amostra estudada.

Os resultados obtidos testificam os achados literários, mostrando que os níveis de IL-22 encontram-se aumentados em pacientes com AR, mediana de 118 (31.29 – 429.5) pg/ml, comparados com os controles saudáveis, com mediana de 31.25 (31.25 – 31.25) pg/ml, $p < 0.0001$. Na comparação entre AR e pacientes com Esclerose Sistêmica (ES), que apresentaram mediana 31.25 (31.25 – 108.3) pg/ml, Osteoartrite (OA) e Fibromialgia (FM), ambos com mediana de 31.25 (31.25 – 31.25) pg/ml, os resultados também são significantes ($p < 0.0001$). Os pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), apresentaram níveis de 59.29 (31.25 – 108.3) pg/ml e $p = 0.0002$ quando comparados aos pacientes com AR.

O valor de corte ideal de IL-22 para distinguir pacientes com AR de pacientes não-AR foi de 31,25pg/ml (sensibilidade 74,81%, especificidade

71,56%, LR 2,63 e AUC de 0.754) e para todos os indivíduos foi de 31,25 pg/ml (sensibilidade 74,81%, especificidade 78,14%, LR 3,42 e AUC de 0.780). Quando comparados com controles saudáveis o ponto de corte ideal teve o mesmo valor para as outras análises com sensibilidade de 74,81%, especificidade de 98,53% e AUC de 0.86.

Nossos resultados sugerem que os níveis séricos de IL-22 podem ter potencial para serem utilizados como marcador biológico de diagnóstico na AR. Este é o primeiro estudo a demonstrar a capacidade da IL-22 de diferenciar pacientes com AR e indivíduos com outras doenças reumáticas. Esses achados sugerem que medir os níveis de IL-22 pode ser uma ferramenta útil para avaliar a presença de AR.

Sensitivity and specificity of Interleukin 22 in rheumatoid arthritis

Laurindo Ferreira da Rocha Junior, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego Jr, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Adson Belem Ferreira da Paixão, Kamila de Melo Vilar, Pablo Ramon Gualberto, Hugo Deleon de Lima, Henrique de Ataíde Mariz, Ivan da Rocha Pitta, Maira Galdino da Rocha Pitta

From the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil.

Supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

L.F. Rocha Jr, MS Student, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas and Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

A.L.B.P. Duarte, PhD, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

A.T. Dantas, MS, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

H.A. Mariz, MS, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE;

Adson, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE;

Kamila, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE;

I.R. Pitta, PhD, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE;

M.G.R. Pitta, PhD, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE.

Address correspondence to Dr. M.G.R. Pitta, UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, 50670-901, Brazil. E-mail: mgrpitta@gmail.com

Footline: Rocha Jr, et al: IL-22 accuracy in RA.

ABSTRACT

Background: The interleukin (IL)-22 is a member of the IL-10 family and has been implicated in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA).

Objective: To evaluate the sensitivity and specificity of IL-22 in distinguishing RA among healthy individuals and patients with other rheumatic diseases.

Methods: The levels of IL-22 were measured by ELISA in 135 patients with RA, 211 non-RA patients and 68 healthy controls. Demographic, clinical and laboratory data were collected from hospital records. Associations of serum IL-22 levels among distinct groups of patients were analyzed by univariate comparisons using Mann-Whitney test. Optimum cut-off values were calculated to optimize sensitivity and specificity. Receiver-operating characteristic (ROC) were plotted and the areas under the ROC curves were calculated to assess the performance of IL-22 to distinguish RA from other rheumatic diseases and from healthy controls.

Results: RA patients had significantly increased serum median IL-22 levels 118 (IQR 31.29 – 429.5) pg/ml compared with non-RA patients 31.25 (IQR 31.25 – 108.3) pg/ml and healthy controls 31.25 pg/ml, $p < 0.0001$. The sensitivity of serum IL-22 in differentiating patients with RA from non-RA patients and from healthy controls was of 74,81% (95% CI 66.6 – 81.9). IL-22 ability to distinguish RA from all the subjects of the study demonstrated an AUC from ROC analysis of 0.780 (95% CI 0.736-0.819)

Conclusion: Serum IL-22 levels might have the potential to be used as a diagnostic biologic marker in RA. Further studies with larger number of patients, patients with early RA and treatment naïve patients are necessary in order to better understand IL-22 role as a diagnostic tool in RA.

Key Indexing Terms: cytokine, diagnosis, accuracy.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disorder that causes joint destruction, pain, functional disability and leads to premature mortality¹. Current diagnostic research on RA is focused on improving patient quality of life and on preventing joint destruction through early diagnosis using simple diagnostic methods².

No diagnostic criteria exist for rheumatoid arthritis. The diagnosis of RA is mainly based on clinical findings and on abnormal laboratory findings such as elevated acute phase reactants erythrocyte sedimentation (ESR) rate and C-reactive protein (PCR) and also the presence of the autoantibodies rheumatoid factor and anti-citrullinated peptide antibodies³.

It is well known the role of cytokines in immunopathogenesis of RA⁴. However, few studies have evaluated the potential of cytokines in the diagnosis of this disease. RA is an inflammatory disease that is preceded by a period of autoimmunity characterized by elevations in antibodies, inflammatory markers, and cytokines^{5,6}.

The cytokine interleukin (IL)-22 is a member of the IL-10 family and has been implicated in the pathogenesis of RA⁷. Our group, in a previous study described that increased levels of IL-22 correlated with disease activity and were associated with the presence of rheumatoid factor antibody and bone erosions⁸. To our knowledge, there are no previous studies that evaluated IL-22 accuracy in identifying RA among individuals with diseases in which joint complaints may be a clinical feature. Thus, the objective of this work is to evaluate the sensitivity and specificity of IL-22 in distinguishing RA among healthy individuals and patients with other rheumatic diseases.

PATIENTS AND METHODS

Study Population

A total of 135 patients with RA (8 males, 127 females; Mean age 53.5, range 28-77) were recruited from the Department of Rheumatology at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Current medications were recorded (Table 1). Six patients were under biological therapy with TNF blockers (5 with adalimumab, 1 with etanercept). The diagnosis of RA was established by American College of Rheumatology (ACR) 1987 diagnostic criteria or by the ACR/EULAR 2010 classification criteria^{9,10}. Individuals with other rheumatologic diseases included 60 patients with Systemic Sclerosis (SSc), 74 patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE), 48 patients with Osteoarthritis (OA) and 29 patients with Fibromyalgia (FM). All the patients with SLE, SSc, OA and FM met the American College of Rheumatology criteria for each disease^{11,12,13,14,15,16}. Patients with overlap syndromes were excluded. About 68 healthy volunteers were included as controls, all of them did not have any rheumatologic conditions and were not taking any medications for the last two weeks. Non-RA patients and healthy controls were matched by gender or age with RA group. Peripheral blood samples were obtained from patients and healthy volunteers. Informed consent was obtained from all study participants.

Demographic, clinical and laboratory data were collected from hospital records or by questionnaire and reviewed by experienced physicians. Table 1 presents demographic and clinical findings in patients with RA.

Table 1.

Laboratory features of RA patients such as erythrocyte sedimentation rate (ESR) and rheumatoid factor (RF) positivity were recorded. Individual disease activity was quantified using the disease activity score (DAS28)¹⁷ and the Clinical Activity Index (CAI)¹⁸. Functional capacity was evaluated by Health Assessment Questionnaire-Disability Index (HAQ-DI)¹⁹. Radiographs of hands were obtained from 108 RA patients and evaluated for the presence of erosions by an experienced rheumatologist blinded to the clinical data. The study was approved by the ethics committee of the UFPE (protocol 1.486.537).

Measurement of serum IL-22 levels

Cytokines in sera were assayed with an ELISA kit according to the manufacturer's recommendation (R&D Systems). The lower limit of detection for ELISA IL-22 kit was 31.25 pg/ml. All assays were performed in duplicate.

Statistical analysis

Cytokine levels were presented as median and interquartile range (25th-75th percentile). Associations of serum IL-22 levels among distinct groups of patients were analyzed by univariate comparisons using Mann-Whitney.

We used the 1987 revised American College of Rheumatology (ACR) criteria or 2010 ACR/EULAR criteria as the reference standard of diagnosis of RA. Optimum cut-off values were calculated to optimize sensitivity and specificity (i.e. the Young Index). Receiver-operating characteristic (ROC) were plotted (sensitivity against 100-specificity) and the areas under the ROC curves were calculated to assess the performance of IL-22 to distinguish RA from other rheumatic diseases and from healthy controls. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. All tests were two-tailed. All quantitative data were plotted with Graph Pad Prism 6.01 software and MedCalc 17.4.4.

RESULTS

Serum IL-22 levels in patients with RA and controls

In total, 135 patients with RA, 211 non-RA patients and 68 healthy controls were included in our analysis. RA patients had significantly increased serum median IL-22 levels 118 (IQR 31.29 – 429.5) pg/ml compared with SSc patients 31.25 (IQR 31.25 – 108.3) pg/ml, OA patients 31.25 pg/ml, FM patients 31.25 pg/ml and healthy controls 31.25 pg/ml, *p* < 0.0001. Although SLE patients had expressed high levels of IL-29 median 59.29 (IQR 31.25 – 108.3) pg/ml these levels were lower than RA, *p*=0.0002 (Figure 1). When RA serum levels were compared to all the subjects studied and with non-RA patients the medians were 31.25 pg/ml for both groups and interquartile ranges were 31.25 – 31.25 pg/ml and 31.25 – 58.7, respectively. This analysis was also significant

($p < 0.0001$). Patients with OA, FM and healthy controls had serum IL-22 median levels under the lower limit of detection in the analysis. Four out of 29 FM patients, 8 out of 48 OA patients and 1 healthy control had higher IL-22 serum levels above the lower limit of the detection analysis.

Serum levels of RA patients according to disease duration

Of note, we stratified RA patients into two subgroups according to disease duration (less than one year of disease and more than one year of disease). Twenty patients had disease duration less than one year and had median levels of IL-22 of 90.00 (52.25-212.6) pg/ml. The remaining 116 patients with more than one year of disease duration had median levels of 127.1 (15.63-447.4) pg/ml. Comparing the median levels of the groups there was no statistical difference ($p = 0.6109$).

When dividing RA patients into less than 2 years of disease duration and more than 2 years of disease duration the median IL-22 levels were 98.57 (36.05-456.0) pg/ml and 138 (28.52-441.5) pg/ml, respectively. There was no statistical difference in IL-22 levels between the groups either ($p = 0.8795$).

Sensitivity and specificity of serum IL-22 to distinguish RA from non-RA patients and healthy controls

Of note, we investigated the sensibility and specificity of IL-22 in distinguishing RA from other rheumatic diseases and from healthy controls. The diagnostic performance of serum IL-22 in differentiating patients with RA from non-RA patients and from healthy controls as well as the optimal cut off values of IL-22 and the positive likelihood ratios (LR) are summarized in table 2.

The AUC from ROC analysis was 0.652 (95% CI 0.583-0.716) for IL-22 in distinguishing RA from SLE, 0.847 (95% CI 0.788-0.894) from SSc, 0.764 (95% CI 0.696-0.824) from OA, 0.803 (95% CI 0.734-0.861) from FM and 0.860 (95% CI 0.804-0.904) from healthy controls. Whereas when taken together all non-RA patients, the AUC from ROC analysis was 0.754 (95% CI 0.705-0.798). Meanwhile IL-22 ability to distinguish RA from all the subjects of the study

demonstrated an AUC from ROC analysis of 0.780 (95% CI 0.736-0.819) (FIGURE 2).

DISCUSSION

The present study demonstrated that IL-22 levels were increased in patients with RA compared with non-RA patients and healthy controls. The performance of IL-22 in distinguishing RA from other rheumatic diseases and from all the individuals of the study (patients with other rheumatic diseases and healthy controls) was calculated and demonstrated by the values of sensitivity and specificity. Taken only healthy individuals, IL-22 showed good accuracy. Furthermore, it was possible to obtain cut-off values for IL-22 for discriminating patients with RA and non-RA patients or healthy individuals.

The importance of prompt diagnosis and treatment of RA, particularly in early stages, has been focus of research in order to alleviate inflammation and improve clinical outcome²⁰. However, there is no gold standard or specific test to identify RA. The main clinically useful biologic markers for the diagnosis of RA are the antibodies rheumatoid factors RF and ACPA. However, neither of the tests is of sufficient accuracy alone to establish the diagnosis of RA²¹. A meta-analysis reported the overall sensitivity of RF to be 69% (95% CI 65% to 73%) with a range from 20.5 to 100%. The pooled specificity, positive and negative likelihood ratios were 85% (95% CI, 82% to 88%), 4.86 (95% CI, 3.95 to 5.97), and 0.38 (95% CI, 0.33 to 0.44)²². Therefore, the performance characteristics of ACPA was evaluated in a systematic review and meta-analyses of 151 studies in 2010²³. Sensitivity of ACPA was 67%, and the specificity was 96%. The sensitivity of ACPA was lower for detecting early rheumatoid arthritis than for detecting established rheumatoid arthritis²³. When combining both RF and anti-CCP the sensitivity was 57% (95% CI, 55% - 59%) and specificity was 96% (95% CI, 96% - 97%)²⁴. As for IL-22, the present work demonstrated a higher sensitivity (74.81%) and lower specificity (78.14%).

The present study demonstrated optimal cut-off points of serum IL-22 to identify RA among the subjects studied. However, some groups had cut-off points and sensitivities with the same values. This might be due to the expression of IL-22 under the lower limit of detection in the analysis (Table 2).

Although classification criteria are widely used for diagnostic purposes, these tools are able to identify disease with great specificity, mostly at a late stage of disease. While diagnostic criteria are able to diagnose disease at an early stage with higher sensitivity^{25; 26}. In 2008, a systematic review investigated the accuracy of the 1987 ACR criteria using expert opinion as the gold standard for the diagnosis of RA²⁷. The specificity of ACR 1987 criteria in early RA was low according to the two models used by the authors (77% and 33%) and sensitivity was 77% and 80%. Sensitivity (79% and 80%) and specificity (90% and 93%) in established RA were higher for both models used by the authors. Although our study did not stratified patients with early RA and established RA to determine sensitivity and specificity, levels of serum IL-22 were not different between these two groups.

The sensitivity and specificity for the 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria was evaluated 313 undiagnosed subjects. The sensitivity of the 2010 criteria for the 82 eligible 73.5 and specificity was 71.4%. As for the 1987 ACR criteria the specificity was 47.1 and specificity was 92.9%. Patients from this study had median disease duration of 18 months (range 1-1040)²⁸. In our sample, comparing to non-RA subjects the calculated sensitivity was 74.81% and 71.56%, respectively, similar to the results of the mentioned study for 2010 ACR/EULAR criteria. Based on the same study our calculated sensitivity compared non-RA patients was higher but with lower specificity compared to ACR 1987 criteria.

Ye et. al evaluated the sensitivity and specificity of the 2010 ACR/EULAR criteria and ACR 1987 in 202 patients diagnosed with RA and 197 patients with other rheumatic diseases (non-RA controls). The 2010 ACR/EULAR had a calculated sensitivity of 72.3% and specificity of 83.2. Whereas the 1987 ACR criteria had sensitivity of 39.1% and 92.4%²⁹. Our findings based on non-RA patients demonstrated slightly higher superiority compared to 2010 ACR/EULAR criteria and lower specificity. As for the 1987 criteria our data obtained higher sensitivity and lower specificity. It is important to note that we did not stratify patients classified by the criteria used to include in our study and comparisons to other studies must take it into consideration.

This work has some limitations. The patients evaluated were under treatment for the underlying disease and mean disease duration of RA patients

were 9.6 years. Although when we divided patients in two groups according to disease duration (less or more than 2 years) there were no differences between IL-22 levels (data not shown). Of note, estimates of the sensitivity and specificity of any index test vary depending upon the populations being examined. Thus, the pooled accuracy measures reported here must be interpreted in this context.

CONCLUSIONS

The results of this work provide data on sensitivity and specificity of IL-22 in a group of patients with RA. Serum IL-22 levels might have the potential to be used as a diagnostic biologic marker in RA. Further studies with larger number of patients, patients with early RA and treatment naïve patients are necessary in order to better understand IL-22 role as a diagnostic tool in RA. An interesting diagnostic approach for future research might be the combination of measuring IL-22 serum levels with RF and/or ACPA in order to improve diagnostic accuracy of these biomarkers in RA.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-IF) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

DECLARATION OF CONFLICTING INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Table 1. Demographic, clinical, and laboratory presentation of the patients with rheumatoid arthritis (RA).

Data from RA patients	
No. patients	135
Age, yrs, mean (range)	53.5 (28 – 77)
Female/male	127/8
Disease duration, mean (range)	9.6 years (0.1 – 45.4)
Rheumatoid factor (%)	
Positive	103 (76.3%)
Negative	32 (23.7%)
Radiological erosions (%)	n = 108 (100)
Present	80 (74 %)
Absent	28 (26 %)
Treatment (%)	
Steroids	103 (76.3 %)
Methotrexate	81 (60 %)
Leflunomide	41 (30.4 %)
Antimalarial agents	18 (13.3 %)
Disease Activity Score 28 joints (DAS 28) (%)	
Clinical remission	9 (6.7 %)
Mild disease	11 (8.1 %)
Moderate disease	61 (45.2 %)
Severe disease	54 (40 %)

Table 2. Diagnostic performance of serum IL-22 in distinguishing RA patients from non-RA patients and healthy controls.

	Subjects tested	Optimal cut-off values (pg/ml)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	LR
SLE	74	173.25	44.44 (35.9 – 53.2)	89.19 (79.8 – 95.2)	4.11
SSc	60	31.25	74.81 (66.6 – 81.9)	93.33 (83.8 – 98.2)	11.22
OA	48	31.25	74.81 (66.6 – 81.9)	83.33 (69.8 – 92.5)	4.49
FM	29	31.25	74.81 (66.6 – 81.9)	86.21 (68.3 – 96.1)	5.42
NON-RA	211	31.25	74.81 (66.6 – 81.9)	71.56 (65 – 77.5)	2.63
NHS	68	31.25	74.81 (66.6 – 81.9)	98.53 (92.1 – 100)	50.87
Overall	279	31.25	74.81 (66.6 – 81.9)	78.14 (72.8 – 82.8)	3.42

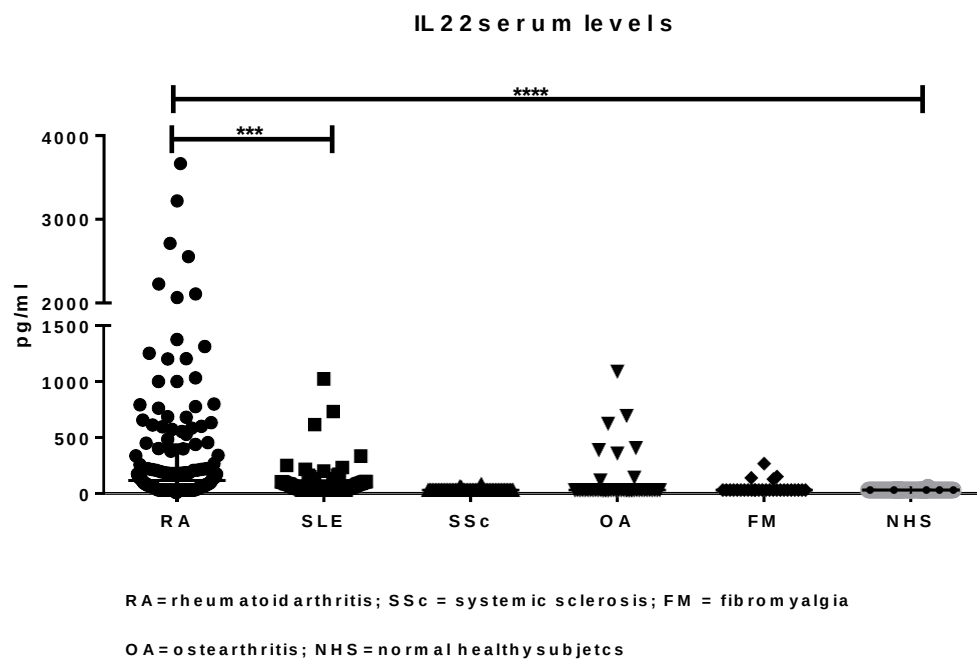


Figure 1. Levels of IL-22 in serum from RA-patients, non-RA patients and healthy controls. ** $p < 0.0001$ for Rheumatoid arthritis (RA) vs Systemic Sclerosis, Fibromyalgia, Osteoarthritis and Normal Healthy subjects; *** $p = 0.0002$ for RA vs Systemic Lupus Erythematosus.**

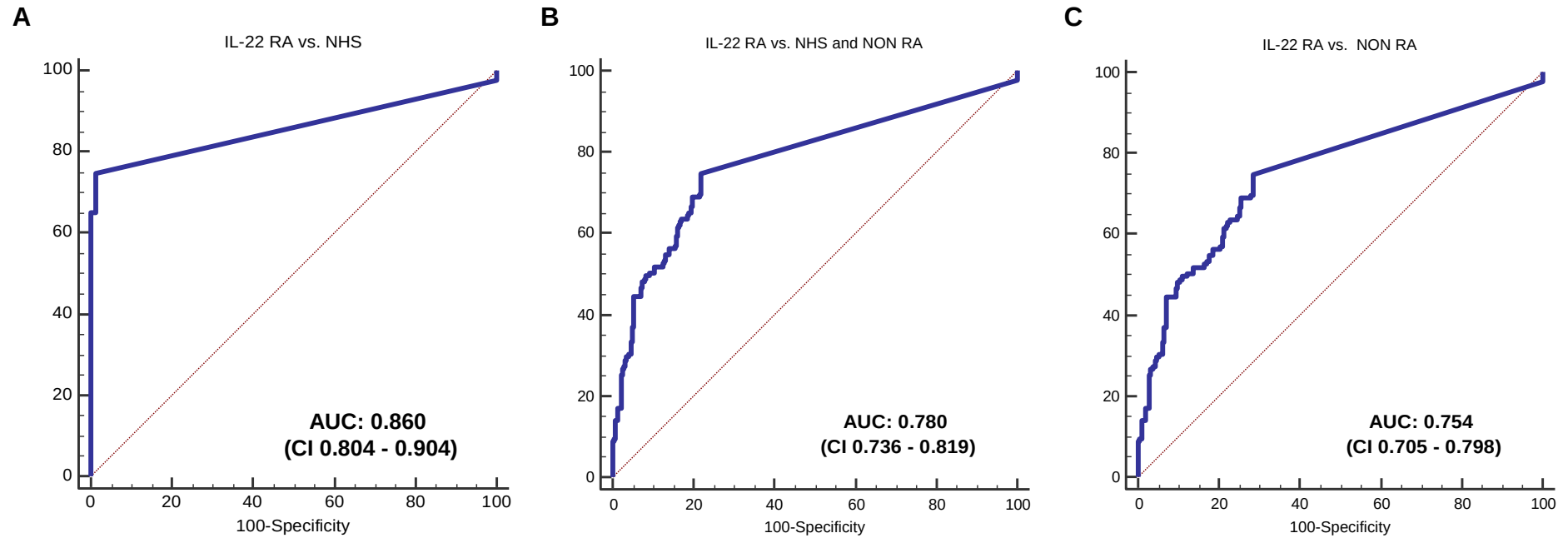


Figure 2. Receiver operating characteristic curve for IL-22 validity in rheumatoid arthritis (RA) patients and normal healthy subjects (NHS) (A), RA, NHS and other rheumatic diseases (NON RA) (B), RA and NON RA (C). AUC: area under the curve. CI: confidence interval.

REFERENCES

- 1 KVIEN, T. K. Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. **Pharmacoeconomics**, v. 22, n. 2 Suppl 1, p. 1-12, 2004. ISSN 1170-7690. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157000>>.
- 2 NAKKEN, B. et al. Biomarkers for rheumatoid arthritis: From molecular processes to diagnostic applications-current concepts and future perspectives. **Immunol Lett**, May 2017. ISSN 1879-0542. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28526580>>.
- 3 SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023-2038, Oct 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156434>>.
- 4 AZIZI, G.; JADIDI-NIARAGH, F.; MIRSHAFIEY, A. Th17 Cells in Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. **Int J Rheum Dis**, v. 16, n. 3, p. 243-53, Jun 2013. ISSN 1756-185X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981743>>.
- 5 KOKKONEN, H. et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 2, p. 383-91, Feb 2010. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112361>>.
- 6 DEANE, K. D. et al. The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 11, p. 3161-72, Nov 2010. ISSN 1529-0131. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597112>>.
- 7 XIE, Q.; HUANG, C.; LI, J. Interleukin-22 and rheumatoid arthritis: emerging role in pathogenesis and therapy. **Autoimmunity**, v. 48, n. 2, p. 69-72, Mar 2015. ISSN 1607-842X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483133>>.
- 8 DA ROCHA, L. F. et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. **J Rheumatol**, v. 39, n. 7, p. 1320-5, Jul 2012. ISSN 0315-162X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589261>>.
- 9 ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 31, n. 3, p. 315-24, Mar 1988. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796>>.
- 10 ALETAHA, D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 9, p. 1580-8, Sep 2010. ISSN 1468-2060. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699241>>.
- 11 Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. **Arthritis Rheum**, v. 23, n. 5, p. 581-90, May 1980. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591.
- 12 ALTMAN, R. et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. **Arthritis Rheum**, v. 33, n. 11, p. 1601-10, Nov 1990. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2242058>>.
- 13 . Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. **Arthritis Rheum**, v. 29, n. 8, p. 1039-49, Aug 1986. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3741515>>.
- 14 . The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. **Arthritis Rheum**, v. 34, n. 5, p. 505-14, May 1991. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025304>>.

- 15 WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. **Arthritis Rheum**, v. 33, n. 2, p. 160-72, Feb 1990. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2306288>>.
- 16 HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 40, n. 9, p. 1725, Sep 1997. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9324032>>.
- 17 PREVOO, M. L. et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 38, n. 1, p. 44-8, Jan 1995. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7818570>>.
- 18 ALETAHA, D. et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 4, p. R796-806, 2005. ISSN 1478-6362. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987481>>.
- 19 FRIES, J. F.; SPITZ, P. W.; YOUNG, D. Y. The dimensions of health outcomes: the health assessment questionnaire, disability and pain scales. **J Rheumatol**, v. 9, n. 5, p. 789-93, 1982 Sep-Oct 1982. ISSN 0315-162X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7175852>>.
- 20 DEMORUELLE, M. K.; DEANE, K. D. Treatment strategies in early rheumatoid arthritis and prevention of rheumatoid arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 14, n. 5, p. 472-80, Oct 2012. ISSN 1534-6307. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773387>>.
- 21 SONG, Y. W.; KANG, E. H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. **QJM**, v. 103, n. 3, p. 139-46, Mar 2010. ISSN 1460-2393. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926660>>.
- 22 NISHIMURA, K. et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 146, n. 11, p. 797-808, Jun 2007. ISSN 1539-3704. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548411>>.
- 23 WHITING, P. F. et al. Systematic review: accuracy of anti-citrullinated Peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 152, n. 7, p. 456-64; w155-66, Apr 06 2010. ISSN 0003-4819.
- 24 SUN, J. et al. Diagnostic accuracy of combined tests of anti cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 32, n. 1, p. 11-21, 2014 Jan-Feb 2014. ISSN 0392-856X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050751>>.
- 25 DOUGADOS, M.; GOSSEC, L. Classification criteria for rheumatic diseases: why and how? **Arthritis Rheum**, v. 57, n. 7, p. 1112-5, Oct 2007. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17907226>>.
- 26 JOHNSON, S. R. et al. Classification criteria in rheumatic diseases: a review of methodologic properties. **Arthritis Rheum**, v. 57, n. 7, p. 1119-33, Oct 2007. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17907227>>.
- 27 BANAL, F. et al. Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 7, p. 1184-91, Jul 2009. ISSN 0003-4967.

- ²⁸ KANEKO, Y. et al. Sensitivity and specificity of 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. **Rheumatology (Oxford)**, v. 50, n. 7, p. 1268-74, Jul 2011. ISSN 1462-0332. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292733>>.
- ²⁹ YE, H. et al. Comparison of three classification criteria of rheumatoid arthritis in an inception early arthritis cohort. **Clin Rheumatol**, v. 35, n. 10, p. 2397-401, Oct 2016. ISSN 1434-9949. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27129710>>.

5 DISCUSSÃO

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica autoimune progressiva e uma das mais comuns doenças inflamatórias da articulação com ampla distribuição mundial (McInnes e Schett, 2011). A primeira fase de progressão da doença inclui um estado em que indivíduos desenvolvem características de autoimunidade sistêmica que podem ser mensuradas por alterações laboratoriais e são conhecidas por estarem associadas com a AR, como por exemplo, os anticorpos anti-proteínas citrulinadas (ACPAs) e o fator reumatoide. Nesta fase, os indivíduos ainda não apresentam nenhum sintoma ou sinal de artrite inflamatória. Em estágio seguinte, ocorre o surgimento de sintomas como artralgia e/ou rigidez matinal, ainda sem evidência de sinovite clínica. E então, a última fase de desenvolvimento da doença é reconhecida pelo aparecimento de sinovite detectada ao exame clínico como artrite inflamatória que pode ou não contemplar os critérios de classificação de AR (Arnett *et al.* 1988; Aletaha *et al.*, 2010; Gerlag *et al.*, 2012).

A importância de novos biomarcadores de diagnóstico em fases mais iniciais da doença tem sido foco de estudo ultimamente (Demoruelle e Deane, 2012). Atualmente não existe teste “padrão ouro” ou teste específico para identificar AR. Os principais marcadores biológicos utilizados na prática clínica para o diagnóstico de AR são o fator reumatoide e o anti-CCP. Nenhum destes biomarcadores tem acurácia suficiente para estabelecer o diagnóstico de AR quando usados isoladamente (Song e Kang, 2010).

Sintomas articulares são características clínicas muito comuns em pacientes com as doenças estudadas nesse trabalho. Além disso, profissionais médicos atendem muitos pacientes que se queixam de artralgia na prática clínica. Atualmente, sabe-se que muitos destes pacientes podem estar em risco de desenvolver doenças reumatológicas como artrite reumatoide ou outras doenças que podem apresentar dor articular como queixa inicial como as estudadas e apresentadas no escopo deste trabalho (lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, fibromialgia e osteoartrite) (Van Steenbergen e Van Der Helm-Van Mil, 2016). Pacientes em alto risco para desenvolver AR necessitam ser identificados o mais precocemente possível, já que o tratamento da AR em suas fases bem iniciais pode ser bastante benéfico para os pacientes (Smolen e

Aletaha, 2015).

A descoberta de novos biomarcadores de diagnóstico para AR ainda é uma área essencial visto que, atualmente, o diagnóstico é feito baseado em sinais e sintomas, alterações laboratoriais e alterações em exames de imagem. (Smolen *et al.*, 2016). A presente tese demonstrou que níveis séricos das interleucinas 29 e 22 estão aumentadas em pacientes com AR quando comparados com pacientes com outras doenças reumatológicas e indivíduos saudáveis. Além disso, a capacidade destas citocinas em distinguir pacientes com AR entre estes indivíduos com outras doenças reumatológicas ou pessoas saudáveis também foi evidenciada através de medidas de acurácia utilizadas em validação de testes diagnósticos. Desta forma, é possível sugerir que as citocinas avaliadas podem ser proteínas candidatas a serem biomarcadores de diagnóstico.

A IL-29 apresentou níveis séricos aumentados em pacientes com AR quando comparados individualmente com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), Esclerose sistêmica, osteoartrite, fibromialgia e controles saudáveis. Níveis de IL-29 aumentados já foram descritos anteriormente no Lúpus, quando comparados com controles saudáveis, particularmente em pacientes com doença ativa (Oke *et al.*, 2017). Apesar de não publicados, os níveis de IL-29 nos pacientes com LES avaliados no nosso estudo foram maiores que controles. No entanto não foram maiores que os pacientes com AR.

Na Esclerose sistêmica, um recente estudo desenvolvido por nosso grupo demonstrou que níveis desta citocina estão aumentados quando comparados com controles saudáveis e que essa citocina teve uma correlação positiva com níveis de IFN- γ (Dantas *et al.*, 2015). Apesar de ter sido reportada como contribuidora da patogênese da osteoartrite, níveis aumentados de IL-29 foram encontrados no líquido sinovial de pacientes com AR comparados a pacientes com OA (Wang *et al.*, 2012). Mesmo com relatos de estudos que demonstram uma expressão aumentada da IL-29 nas doenças estudadas, os pacientes com AR desse estudo tiveram maior expressão sérica dessa proteína, quando comparados com todos os grupos analisados.

Níveis aumentados de IL-29 também já foram relatados em estudos anteriores. Contudo, no presente estudo não foi encontrada nenhuma associação dos níveis de IL-29 em pacientes com AR com alguns parâmetros

clínicos laboratoriais avaliados como o questionário de avaliação de capacidade funcional HAQ (do inglês, *Health Assessment Questionnaire*), velocidade de sedimentação das hemácias e os índices de atividade da doença (DAS28 e CDAI). Estes achados estão em contraste com estudo recentemente publicado que evidenciou associação de IL-29 sérica com os parâmetros anteriormente citados em pacientes com o anticorpo anti-CCP (Chang *et al.*, 2017). Por outro lado, Wang e colaboradores não encontraram nenhuma correlação da IL-29 com os anticorpos fator reumatoide e anti-CCP (Wang *et al.*, 2012). Vale ressaltar que anticorpos anti-CCP não foram investigados nos nossos pacientes. Diante dos dados controversos da IL-29 com parâmetros clínicos e laboratoriais na AR, faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos com maior número de pacientes.

Outra observação deste trabalho foi que níveis de IL-29 tem correlação negativa com a idade da população estudada e duração da doença. Chang e colaboradores descreveram associação de IL-29 com a presença do anticorpo anti-CCP (Chang *et al.*, 2017). A quebra do mecanismo de autotolerância associada à produção aumentada de autoanticorpos é uma condição que está presente nas fases iniciais das doenças autoimunes incluindo a AR. Outra possível explicação para esse achado é que em faixas mais avançadas de idade há existência do processo de imunossenescência com relativa deterioração do sistema imune e menor produção de seus mediadores (Burska *et al.*, 2014).

Ao fazer análise laboratorial dos pacientes com AR e sua correlação com níveis de IL-29, encontramos uma correlação positiva do número absoluto de neutrófilos em pacientes com fator reumatoide positivo e uma correlação negativa em pacientes com fator reumatoide negativo. Pacientes com fator reumatoide estão relacionados a uma doença com carga inflamatória maior e de pior prognóstico. Nestes pacientes pode haver maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e que tenham associação com quimiotaxia de neutrófilos (IL-6 e IL-8) (Kaplanski *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2013).

Nesta tese, demonstramos, pela primeira vez, valores de ponto de corte de IL-29 para discriminar pacientes com AR entre pacientes com outras doenças reumatológicas, com sensibilidade de 57% e especificidade de 92,7%. Uma revisão sistemática realizada em 2010 avaliou a acurácia dos anticorpos

anti-CCP em 151 estudos e evidenciou 67% de sensibilidade e 96% de especificidade (Whiting *et al.*, 2010). Quanto ao fator reumatoide, uma meta-análise importante evidenciou uma sensibilidade de 69% e especificidade de 85% (Nishimura *et al.*, 2007).

Ao realizarmos os testes de acurácia para IL-22, foi possível demonstrar que níveis de IL-22 estavam maiores em pacientes com AR quando comparados a pacientes sem AR e controles saudáveis. A habilidade da IL-22 em distinguir artrite reumatoide das outras doenças reumatológicas avaliadas levou a uma moderada sensibilidade e especificidade. Se comparada apenas a indivíduos saudáveis a IL-22 mostrou moderada sensibilidade e alta especificidade. Os pontos de corte para os níveis de IL-22 para discriminar pacientes com AR de pacientes com outras doenças reumatológicas e de indivíduos saudáveis também foram reportados.

Os dados mais consistentes que analisaram o desempenho diagnóstico do fator reumatoide são oriundos de uma metanálise que relatou uma sensibilidade de 69% (IC 65% a 73%) com uma variação de 20,5 a 100%. A especificidade estimada foi de 85% (IC, 82 a 88%). As razões de verossimilhança positiva e negativa foram de 4.86 (IC, 3.95 to 5.97) e 0.38 (IC, 0.33 to 0.44) (Nishimura *et al.*, 2007). Já a acurácia do ACPA foi avaliada em uma revisão sistemática envolvendo 151 estudos, realizada em 2010. (Whiting *et al.*, 2010). A sensibilidade estimada foi de 67% e a especificidade de 96%. A sensibilidade do ACPA foi mais baixa para detectar artrite reumatoide inicial comparada a sensibilidade para identificar AR estabelecida. Quando combinados os dois anticorpos FR e anti-CCP a sensibilidade foi de 57% (IC, 55% a 59%) e a especificidade de 96% (IC, 96% a 97%)(Sun *et al.*, 2014). Para IL-22, o presente trabalho demonstrou sensibilidade maior que o FR e anti-CCP (74.81%) porém com menor especificidade (78.14%).

Outros estudos avaliaram a acurácia de citocinas na AR. Em 2012, níveis de IL-15 foram avaliados em 144 pacientes com AR e comparados a 55 controles saudáveis. A IL-15 teve sensibilidade de 74.8% e especificidade de 70.4% em identificar pacientes com AR. A presente tese obteve, para IL-29, sensibilidade menor (65,29%), porém especificidade maior 95,59%. Para IL-22, obtivemos o valor semelhante de sensibilidade de 74,81% e especificidade maior de 98,53% Nesse estudo a área sob a curva (AUC) foi similar à do anti-

CCP (0.800 vs. 807). Nossos resultados demonstraram que a IL-29 e IL-22, quando comparada a controles saudáveis, tiveram AUC nos valores de 0.810 e 0.860, respectivamente. Esse trabalho também determinou um ponto de corte ideal para IL-15 na predição da AR e mostrou que esta citocina poderia fazer parte de um modelo de predição de AR junto com fator reumatoide e anti-CCP. Nesse estudo o nível mediano de duração da doença nos pacientes avaliados foi de 11 anos. Nosso trabalho também teve pacientes com tempo médio de duração de doença alta 8,9 anos e 9,6 anos, para IL-29 e IL-22, respectivamente (Pavkova Goldbergova *et al.*, 2012).

Um estudo publicado em 2010 investigou algumas citocinas e quimiocinas, e verificou que estas estão expressas no soro de 86 pacientes com AR, no período anterior ao desenvolvimento da doença. Medidas de acurácia desses marcadores avaliados foram calculadas ao serem comparadas a 256 controle saudáveis. Foram analisados como preditores de doença IL-1RA, IL-2, GM-CSF, IFN-gamma, IL-4, IL-9, TNF-alfa, IL-12, IL-10, IL-1beta, IL-6, MCP-1 (do inglês, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), IL-15, IP-10. Todos os marcadores tiveram baixas sensibilidade, mas apresentaram especificidades maiores que 95,3%. A análise da combinação dos anticorpos anti-CCP e das citocinas divididas por fenótipo de linfócito Th (Th1 and Th2) resultou em sensibilidades de 14,1% e 12,9%, respectivamente, e uma especificidade de 100%. Incluindo todas as citocinas e quimiocinas, todos os fatores avaliados e o anti-CCP o modelo de predição de AR construído pelos autores teve sensibilidade de 51,2% e especificidade de 91,9%(Kokkonen *et al.*, 2010).

Em 2013, outro trabalho demonstrou que níveis baixos de IL-7 eram um bom preditor de AR em 250 pacientes procedentes de uma coorte de pacientes com artrite reumatoide muito inicial (menos de 6 meses de duração). Em pacientes negativos para ACPA (n=199), níveis baixos de IL-7 foi o marcador mais específico de predição de AR com sensibilidade de 27,5% e especificidade de 83%. Houve diminuição dos valores de sensibilidade quando combinados a presença de ACPAs com IL-7, sugerindo que essa interleucina seria um marcador independente(Goeb *et al.*, 2013).

A performance diagnóstica da IL-13 e IL-17 foi investigada recentemente. Um estudo incluiu 30 pacientes com artrite reumatoide inicial e comparou com 28 controles. Para a IL-13 a área sob a curva foi de 1.00, com

sensibilidade e especificidade de 100%. Enquanto a IL-17 obteve uma AUC de 0.902, com sensibilidade de 86.67% e especificidade de 100%. Embora os valores de razões de verossimilhança obtidos para IL-13 e IL-17, foram altos com os valores de 28 e 24,17, respectivamente, as razões de verossimilhança negativa tiveram valores maiores que 1.00 (Silosi *et al.*, 2016). Posteriormente, com um desenho parecido ao estudo anterior, os mesmos autores avaliaram a acurácia da IL-6 e obtiveram valor de sensibilidade e especificidade de 100% e estabeleceram um ponto de corte ideal para essa citocina. A AUC para IL-6 foi 1.00. Para o TNF-alfa a sensibilidade foi 90% e especificidade de 100% e área sob a curva de 0.905 (Silosi *et al.*, 2017).

A análise proteômica realizada em 56 pacientes com AR em um estudo publicado em 2007 demonstrou níveis aumentados de TNF- α , IL-1beta, IL-6, IL-12p40, IL-13 em soro de pacientes com AR com menos de seis meses de duração de sintomas comparados com controles saudáveis. Este perfil demonstrado nessa análise foi específico de AR e não foi reproduzido nos pacientes com espondilite anquilosante ou artrite psoriásica avaliados no estudo. Os resultados expressivos do estudo foram restritos a pacientes com ACPA-positivos sugerindo que um perfil inflamatório mais evidente estaria associado a autorreatividade (Hueber *et al.*, 2007). Diante disso, é notável a necessidade de novas ferramentas que auxiliem no diagnóstico da AR.

Quando um novo teste diagnóstico é introduzido, os profissionais médicos tendem a ser relutantes em parar de usar o teste convencional já utilizado, o que resulta na utilização de dois testes em vez de apenas um, gerando dispêndio de recursos no sistema de saúde. Novos testes geralmente são mais caros que os seus predecessores, o que leva a questão sobre o custo efetividade de sua aplicação. No entanto testes com maior especificidade para diagnosticar uma doença com sequelas importantes em longo prazo se não tratada prontamente devem ter sua aplicação considerada pois sua introdução pode ser custo-efetiva (Whiting *et al.*, 2010).

Na avaliação diagnóstica da AR, o desempenho de biomarcadores pode depender da duração dos sintomas no momento que forem realizados o teste e a carga inflamatória da doença estudada no momento da avaliação. (Burska *et al.*, 2014). Na prática clínica, muitos profissionais médicos recomendam medir ambos anticorpos anti-CCP e FR porque o anticorpo anti-CCP tem moderada

sensibilidade, e há uma tentativa de maximizar a sensibilidade do diagnóstico de AR combinando estes dois marcadores (Nishimura *et al.*, 2007). No entanto, ao maximizar a sensibilidade devemos considerar que podemos ter mais falso-positivos e levar a tratamentos desnecessários e dispendiosos ressaltando a importância de ponderarmos os riscos e os benefícios desta abordagem.

Devemos levar em consideração que os níveis das citocinas avaliadas nesse trabalho podem ter sido influenciados pelo uso de drogas modificadoras do curso de doença e corticosteroides. No entanto, ao estratificarmos os pacientes por tratamento utilizado, não encontramos diferenças nos níveis das citocinas estudadas.

É importante ressaltar o longo tempo de doença que nossos pacientes apresentavam ao serem incluídos no estudo. Porém ao dividirmos pacientes em dois grupos de acordo com tempo de doença em menor que 2 anos e maior que dois anos, ou menor que um ano e maior que um ano, não houve diferença nos níveis séricos de IL-29 e IL-22. A expressão de outras citocinas foram avaliadas pela identificação de genes na sinóvia de pacientes com AR em um estudo anterior. Os genes das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), TGF- β e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) na sinóvia de 16 pacientes com AR não foram diferentes em pacientes com 12 meses de duração de doença comparados a pacientes com AR mais avançada (Canete *et al.*, 1997). Ainda assim, é necessário avaliar pacientes em fases iniciais da doença.

Diante disso, as medidas de acurácia encontradas devem ser avaliadas no contexto da população analisada neste trabalho. Estudos com pacientes virgens de tratamento imunomodulador e com menos tempo de doença são necessários para avaliar a acurácia destas citocinas como ferramentas de diagnóstico na AR. A combinação da dosagem sérica destas citocinas com a investigação de autoanticorpos (FR e anti-CCP) também deve ser objeto de futuros trabalhos com o intuito de maximizar a acurácia de biomarcadores na abordagem diagnóstica de pacientes com suspeita da doença.

Estudos futuros de acurácia com as citocinas estudadas neste trabalho devem incluir uma coorte de diagnóstico envolvendo pacientes com suspeita de artrite reumatoide, incluir uma avaliação dos anticorpos fator reumatoide e anti-CCP, e a inclusão da dosagem sérica das citocinas combinadas ou não a estes

anticorpos. Os resultados deste trabalho fornecem dados de medidas de acurácia das citocinas estudadas em uma amostra de pacientes com AR. Sugere-se que níveis séricos das citocinas analisadas podem ter potencial para uso como um marcador biológico de diagnóstico na AR.

6 CONCLUSÕES

Níveis séricos de IL-29 e IL-22 encontraram-se aumentados em pacientes com AR, quando comparados com controles saudáveis e com outras doenças reumatológicas (lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, osteoartrite e fibromialgia).

Em segundo lugar, houve correlação negativa dos níveis de IL-29 com idade e tempo de doença.

Em pacientes com a presença de autoanticorpo Fator Reumatoide houve correlação positiva dos níveis séricos de IL-29 com a contagem absoluta de neutrófilos e em pacientes sem este anticorpo houve correlação negativa dos níveis da IL-29 com a contagem absoluta de neutrófilos.

A IL-29 e a IL-22 apresentam boa sensibilidade e especificidade para identificar pacientes com AR e os resultados encontrados sugerem que estas citocinas podem ser biomarcadores de acurácia para distinguir artrite reumatoide de controles saudáveis e de outras doenças reumatológicas a população estudada.

REFERÊNCIAS

_____. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. **Arthritis Rheum**, v. 33, n. 11, p. 1601-10, Nov 1990. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2242058>>.

_____. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. **Arthritis Rheum**, v. 29, n. 8, p. 1039-49, Aug 1986. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3741515>>.

_____. Estrogens and autoimmune diseases. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1089, p. 538-47, Nov 2006. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923.

_____. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 2, p. 152-74, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 1809-4570. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460407>>.

AGGARWAL, S. et al. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. **J Interferon Cytokine Res**, v. 21, n. 12, p. 1047-53, Dec 2001. ISSN 1079-9907 (Print)1079-9907.

ALAM, J.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. A. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. **Biomed Pharmacother**, v. 92, p. 615-633, Aug 2017. ISSN 0753-3322.

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

ALAMANOS, Y.; VOULGARI, P. V.; DROSOS, A. A. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. **Semin Arthritis Rheum**, v. 36, n. 3, p. 182-8, Dec 2006. ISSN 0049-0172 (Print)0049-0172.

ALARCON, G. S. Epidemiology of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 21, n. 3, p. 589-604, Aug 1995. ISSN 0889-857X (Print)0889-857X.

ALETAHA, D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 9, p. 1580-8, Sep 2010. ISSN 0003-4967.

ALPIZAR-RODRIGUEZ, D.; FINCKH, A. Environmental factors and hormones in the development of rheumatoid arthritis. **Semin Immunopathol**, v. 39, n. 4, p. 461-468, Jun 2017. ISSN 1863-2297.

ALTMAN, R. et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. **Arthritis Rheum**, v. 34, n. 5, p. 505-14, May 1991. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025304>>.

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 31, n. 3, p. 315-24, Mar 1988. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796>>.

ASQUITH, D. L.; MCINNES, I. B. Emerging cytokine targets in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 19, n. 3, p. 246-51, May 2007. ISSN 1040-8711 (Print)1040-8711.

AUJLA, S. J. et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. **Nat Med**, v. 14, n. 3, p. 275-81, Mar 2008. ISSN 1078-8956.

BANCHUIN, N. et al. Re-evaluation of ELISA and latex agglutination test for rheumatoid factor detection in the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 10, n. 1, p. 47-54, Jun 1992. ISSN 0125-877X (Print)0125-877X.

BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051-7, Jun 19 2008. ISSN 0028-0836.

BURSKA, A.; BOISSINOT, M.; PONCHEL, F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 545493, 2014. ISSN 1466-1861. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24733962>>.

CANETE, J. D. et al. Comparative cytokine gene expression in synovial tissue of early rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies. **Br J Rheumatol**, v. 36, n. 1, p. 38-42, Jan 1997. ISSN 0263-7103 (Print)0263-7103.

CARDIEL, M. H. First Latin American position paper on the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 45 Suppl 2, p. ii7-ii22, Jun 2006. ISSN 1462-0324 (Print)1462-0324.

CARMONA, L. et al. Rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 24, n. 6, p. 733-45, Dec 2010. ISSN 1521-6942.

CARRION, M. et al. IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Rheumatology (Oxford)**, v. 52, n. 12, p. 2177-86, Dec 2013. ISSN 1462-0324.

CARVALHO, M. A. P. et al. **Reumatologia**. Diagnóstico e Tratamento. São Paulo: Grupo Editorial Nacional - Gen. 4ª edição: 303 - 328 p. 2014.

CASTRO-SANTOS, P.; DIAZ-PENA, R. Genetics of rheumatoid arthritis: a new boost is needed in Latin American populations. **Rev Bras Reumatol Engl Ed**, v. 56, n. 2, p. 171-7, Mar-Apr 2016. ISSN 2255-5021.

CHANG, Q. J. et al. Elevated Serum Levels of Interleukin-29 Are Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients with Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies. **Tohoku J Exp Med**, v. 241, n. 2, p. 89-95, 02 2017. ISSN 1349-3329. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28154345>>.

CHUA-AGUILERA, C. J.; MOLLER, B.; YAWALKAR, N. Skin Manifestations of Rheumatoid Arthritis, Juvenile Idiopathic Arthritis, and Spondyloarthritides. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 53, n. 3, p. 371-393, Dec 2017. ISSN 1080-0549.

COHEN, J. F. et al. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. **BMJ Open**, v. 6, n. 11, p. e012799, Nov 14 2016. ISSN 2044-6055.

COHEN, S. B. et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 9, p. 2793-806, Sep 2006. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16947627>>.

COJOCARU, M.; COHOCARU, I. M.; CHICO, B. New insight into the rheumatoid vasculitis. **Rom J Intern Med**, v. 53, n. 2, p. 128-32, Apr-Jun 2015. ISSN 1220-4749 (Print)1220-4749.

CORRADO, A.; MARUOTTI, N.; CANTATORE, F. P. Osteoblast Role in Rheumatic Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, Jun 15 2017. ISSN 1422-0067.

CUTOLO, M. et al. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 2, p. 820-7, Feb 1996. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x.

DA MOTA, L. M. et al. 2011 Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 3, p. 199-219, May-Jun 2011. ISSN 0482-5004.

DA ROCHA, L. F. et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. **J Rheumatol**, v. 39, n. 7, p. 1320-5, Jul 2012. ISSN 0315-162X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589261>>.

DANTAS, A. T. et al. Interferons and systemic sclerosis: correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29). **Autoimmunity**, v. 48, n. 7, p. 429-33, 2015. ISSN 1607-842X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26057401>>.

DE AZEVEDO, A. B.; FERRAZ, M. B.; CICONELLI, R. M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Value Health**, v. 11, n. 5, p. 869-77, Sep-Oct 2008. ISSN 1098-3015.

DE GROEN, R. A.; LIU, B. S.; BOONSTRA, A. Understanding IFN λ in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 1, p. 102, Jan 2014. ISSN 1478-6362. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443794>>.

DEMORUELLE, M. K.; DEANE, K. D. Treatment strategies in early rheumatoid arthritis and prevention of rheumatoid arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 14, n. 5, p. 472-80, Oct 2012. ISSN 1534-6307. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773387>>.

DENARIE, D. et al. Could biomarkers of bone, cartilage or synovium turnover be used for relapse prediction in rheumatoid arthritis patients? **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 537324, 2014. ISSN 0962-9351.

DEQUATTRO, K.; IMBODEN, J. B. Neurologic Manifestations of Rheumatoid Arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 43, n. 4, p. 561-571, Nov 2017. ISSN 0889-857x.

DORNER, T. et al. Rheumatoid factor revisited. **Curr Opin Rheumatol**, v. 16, n. 3, p. 246-53, May 2004. ISSN 1040-8711 (Print)1040-8711.

DUMOUTIER, L. et al. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. **J Biol Chem**, v. 279, n. 31, p. 32269-74, Jul 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166220>>.

EBRINGER, A.; WILSON, C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. **J Med Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 305-11, Apr 2000. ISSN 0022-2615 (Print)0022-2615.

_____. EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 76, n. 3, p. 491-496, Mar 2017. ISSN 0003-4967.

_____. Explaining the cardiovascular risk associated with rheumatoid arthritis: traditional risk factors versus markers of rheumatoid arthritis severity. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 11, p. 1920-5, Nov 2010. ISSN 0003-4967.

EYRE, S. et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. **Nat Genet**, v. 44, n. 12, p. 1336-40, Dec 2012. ISSN 1061-4036.

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

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 183-196, Feb 21 2017. ISSN 1074-7613.

FLORKOWSKI, C. M. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. **Clin Biochem Rev**, v. 29 Suppl 1, p. S83-7, Aug 2008. ISSN 0159-8090 (Print)0159-8090.

GEBOES, L. et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 2, p. 390-5, Feb 2009. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180498>>.

GERLAG, D. M. et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 71, n. 5, p. 638-41, May 2012. ISSN 0003-4967.

GETTS, M. T.; MILLER, S. D. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: triggering of autoimmune diseases by infections. **Clin Exp Immunol**, v. 160, n. 1, p. 15-21, Apr 2010. ISSN 0009-9104.

GOEB, V. et al. Progression to rheumatoid arthritis in early inflammatory arthritis is associated with low IL-7 serum levels. **Ann Rheum Dis**, v. 72, n. 6, p. 1032-6, Jun 2013. ISSN 0003-4967.

GRASSI, W. et al. The clinical features of rheumatoid arthritis. **Eur J Radiol**, v. 27 Suppl 1, p. S18-24, May 1998. ISSN 0720-048X(Print)0720-048x.

GUALTIEROTTI, R. et al. Practical Management of Cardiovascular Comorbidities in Rheumatoid Arthritis. **Rheumatol Ther**, v. 4, n. 2, p. 293-308, Dec 2017. ISSN 2198-6576. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28752316>>.

_____. Guidelines for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 53, n. 2, p. 141-57, Apr 2013. ISSN 0482-5004.

HAZES, J. M.; LUIME, J. J. The epidemiology of early inflammatory arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 7, n. 7, p. 381-90, Jun 14 2011. ISSN 1759-4790.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 40, n. 9, p. 1725, Sep 1997. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9324032>>.

HOCHBERG, M. C. et al. **Rheumatology**. 5. Philadelphia: Elsevier, 2011. 2074 ISBN 987-0-323-06551-1.

HUEBER, W. et al. Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: anti-citrulline autoreactivity is associated with up regulation of proinflammatory cytokines. **Ann Rheum Dis**, v. 66, n. 6, p. 712-9, Jun 2007. ISSN 0003-4967 (Print)0003-4967.

_____. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. **Genes Immun**, v. 8, n. 3, p. 254-61, Apr 2007. ISSN 1466-4879. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17361203>>.

_____. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 18, p. 10144-9, Aug 29 2000. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424.

IKEUCHI, H. et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 4, p. 1037-46, Apr 2005. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

_____. IL-29 enhances Toll-like receptor-mediated IL-6 and IL-8 production by the synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 5, p. R170, Oct 2013. ISSN 1478-6362. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286242>>.

_____. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e31000, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22485125>>.

_____. Increased Th17 cell frequency and poor clinical outcome in rheumatoid arthritis are associated with a genetic variant in the IL4R gene, rs1805010. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 5, p. 1165-75, May 2014. ISSN 2326-5191.

IWASZKO, M. et al. Polymorphisms within the human leucocyte antigen-E gene and their associations with susceptibility to rheumatoid arthritis as well as clinical outcome of anti-tumour necrosis factor therapy. **Clin Exp Immunol**, v. 182, n. 3, p. 270-7, Dec 2015. ISSN 0009-9104.

JORDAN, W. J. et al. Modulation of the human cytokine response by interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29). **Genes Immun**, v. 8, n. 1, p. 13-20, Jan 2007. ISSN 1466-4879. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082759>>.

JUSTA, S.; ZHOU, X.; SARKAR, S. Endogenous IL-22 plays a dual role in arthritis: regulation of established arthritis via IFN-gamma responses. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e93279, 2014. ISSN 1932-6203.

KAPLANSKI, G. et al. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol**, v. 24, n. 1, p. 25-9, Jan 2003. ISSN 1471-4906 (Print)1471-4906.

KAZANTSEVA, M. G. et al. MMP expression in rheumatoid inflammation: the rs11568818 polymorphism is associated with MMP-7 expression at an extra-articular site. **Genes Immun**, v. 14, n. 3, p. 162-9, Apr 2013. ISSN 1476-5470. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343931>>.

KIM, K. et al. Interactions between amino acid-defined major histocompatibility complex class II variants and smoking in seropositive rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 67, n. 10, p. 2611-23, Oct 2015. ISSN 2326-5191.

KIM, K. W. et al. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 4, p. 1015-23, Apr 2012. ISSN 0004-3591.

KINLOCH, A. et al. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 8, p. 2287-95, Aug 2008. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

KLARESKOG, L.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. **Curr Opin Rheumatol**, v. 19, n. 1, p. 49-54, Jan 2007. ISSN 1040-8711 (Print)1040-8711.

KLARESKOG, L. et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 1, p. 38-46, Jan 2006. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

KOKKONEN, H. et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 2, p. 383-91, Feb 2010. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112361>>.

KOTENKO, S. V. IFN-lambdas. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 5, p. 583-90, Oct 2011. ISSN 0952-7915.

KOTENKO, S. V. et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 4, p. 2725-32, Jan 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035029>>.

KUO, C. F. et al. Familial aggregation of rheumatoid arthritis and co-aggregation of autoimmune diseases in affected families: a nationwide population-based study. **Rheumatology (Oxford)**, v. 56, n. 6, p. 928-933, Jun 1 2017. ISSN 1462-0324.

LEE, Y. H.; BAE, S. C. Diagnostic accuracy of anti-Sa and anti-RA33 antibodies in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Z Rheumatol**, v. 76, n. 6, p. 535-538, Aug 2017. ISSN 0340-1855.

LEE, Y. H.; BAE, S. C.; SONG, G. G. Diagnostic accuracy of anti-MCV and anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. **Z Rheumatol**, v. 74, n. 10, p. 911-8, Dec 2015. ISSN 0340-1855.

LEIPE, J. et al. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 8, p. 1453-7, Aug 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593004>>.

LIANG, S. C. et al. IL-22 induces an acute-phase response. **J Immunol**, v. 185, n. 9, p. 5531-8, Nov 1 2010. ISSN 0022-1767.

LIAO, K. P. et al. Anti-cyclic citrullinated peptide revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 11, p. 1557-61, Nov 2008. ISSN 0003-4967.

LIN, S. C. et al. Profiling the expression of interleukin (IL)-28 and IL-28 receptor alpha in systemic lupus erythematosus patients. **Eur J Clin Invest**, v. 42, n. 1, p. 61-9, Jan 2012. ISSN 0014-2972.

LINDEMANS, C. A. et al. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 560-564, Dec 24 2015. ISSN 0028-0836.

LISTING, J.; GERHOLD, K.; ZINK, A. The risk of infections associated with rheumatoid arthritis, with its comorbidity and treatment. **Rheumatology (Oxford)**, v. 52, n. 1, p. 53-61, Jan 2013. ISSN 1462-0324.

MACKEY, R. H.; KULLER, L. H.; MORELAND, L. W. Cardiovascular Disease Risk in Patients with Rheumatic Diseases. **Clin Geriatr Med**, v. 33, n. 1, p. 105-117, Feb 2017. ISSN 0749-0690.

MARIJNISSEN, R. J. et al. Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 10, p. 2939-48, Oct 2011. ISSN 0004-3591.

MARQUES NETO, J. F. et al. **Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira / Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples**. *Rev. bras. reumatol.* 5: 169-173 p. 1993.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 429-42, Jun 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525752>>.

MENNECHET, F. J.; UZE, G. Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4417-23, Jun 01 2006. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971.

MOTA, L. M. et al. Guidelines for the drug treatment of rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 53, n. 2, p. 158-83, Apr 2013. ISSN 0482-5004.

MYASOEDOVA, E. et al. Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality. **Curr Rheumatol Rep**, v. 12, n. 5, p. 379-85, Oct 2010. ISSN 1523-3774.

NAKAMURA, T. Amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis: pathophysiology and treatments. **Clin Exp Rheumatol**, v. 29, n. 5, p. 850-7, Sep-Oct 2011. ISSN 0392-856X (Print)0392-856x.

NISHIMURA, K. et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 146, n. 11, p. 797-808, Jun 2007. ISSN 1539-3704. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548411>>.

NOSS, E. H.; BRENNER, M. B. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. **Immunol Rev**, v. 223, p. 252-70, Jun 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18613841>>.

OKADA, Y. et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 376-81, Feb 20 2014. ISSN 0028-0836.

OKE, V. et al. IFN-lambda1 with Th17 axis cytokines and IFN-alpha define different subsets in systemic lupus erythematosus (SLE). **Arthritis Res Ther**, v. 19, n. 1, p. 139, Jun 15 2017. ISSN 1478-6354.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 71-109, 2011. ISSN 1545-3278. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166540>>.

PAGE, T. H. et al. Raised circulating tenascin-C in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 6, p. R260, Nov 29 2012. ISSN 1478-6354.

PAUL, B. J.; KANDY, H. I.; KRISHNAN, V. Pre-rheumatoid arthritis and its prevention. **Eur J Rheumatol**, v. 4, n. 2, p. 161-165, Jun 2017. ISSN 2147-9720 (Print)2147-9720.

PAVKOVA GOLDBERGOVA, M. et al. Circulating cytokine pattern and factors describing rheumatoid arthritis: IL-15 as one of the biomarkers for RA? **Biomarkers**, v. 17, n. 7, p. 655-62, Nov 2012. ISSN 1354-750x.

PEDERSEN, J. K. et al. Incidence of rheumatoid arthritis from 1995 to 2001: impact of ascertainment from multiple sources. **Rheumatol Int**, v. 29, n. 4, p. 411-5, Feb 2009. ISSN 1437-160X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853167>>.

PIERER, M. et al. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. **J Immunol**, v. 172, n. 2, p. 1256-65, Jan 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707104>>.

RADNER, H.; SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D. Comorbidity affects all domains of physical function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 50, n. 2, p. 381-8, Feb 2011. ISSN 1462-0332. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21036875>>.

RENAULD, J. C. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 8, p. 667-76, Aug 2003. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1733.

RIZZO, C. et al. Ultrasound in rheumatoid arthritis. **Med Ultrason**, v. 15, n. 3, p. 199-208, Sep 2013. ISSN 1844-4172.

RONNINGEN, K. S. et al. Rheumatoid arthritis may be primarily associated with HLA-DR4 molecules sharing a particular sequence at residues 67-74. **Tissue Antigens**, v. 36, n. 5, p. 235-40, Nov 1990. ISSN 0001-2815 (Print)0001-2815.

RUDAN, I. et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis. **J Glob Health**, v. 5, n. 1, p. 010409, Jun 2015. ISSN 2047-2978 (Print)2047-2978.

RUPP, I. et al. Comorbidity in patients with rheumatoid arthritis: effect on health-related quality of life. **J Rheumatol**, v. 31, n. 1, p. 58-65, Jan 2004. ISSN 0315-162X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14705219>>.

SAKKAS, L. I. et al. The Infectious Basis of ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1853, 2017. ISSN 1664-302X (Print)1664-302x.

SARKAR, S. et al. Interleukin-22 reduces the severity of collagen-induced arthritis in association with increased levels of interleukin-10. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 4, p. 960-71, Apr 2013. ISSN 0004-3591.

SATO, K. Th17 cells and rheumatoid arthritis--from the standpoint of osteoclast differentiation. **Allergol Int**, v. 57, n. 2, p. 109-14, Jun 2008. ISSN 1323-8930 (Print)1323-8930.

SATTAR, N. et al. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. **Circulation**, v. 108, n. 24, p. 2957-63, Dec 16 2003. ISSN 0009-7322.

SCHERER, H. U.; BURMESTER, G. R. Adaptive immunity in rheumatic diseases: bystander or pathogenic player? **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 25, n. 6, p. 785-800, Dec 2011. ISSN 1521-6942.

SCHWENZER, A. et al. Identification of an immunodominant peptide from citrullinated tenascin-C as a major target for autoantibodies in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 10, p. 1876-83, Oct 2016. ISSN 0003-4967.

SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **J Rheumatol**, v. 31, n. 3, p. 594-7, Mar 2004. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

SHABGAH, A. G. et al. Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections. **Autoimmun Rev**, v. 16, n. 12, p. 1209-1218, Dec 2017. ISSN 1873-0183. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29037907>>.

SHEN, H.; GOODALL, J. C.; HILL GASTON, J. S. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 6, p. 1647-56, Jun 2009. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

SIEBERT, S. et al. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 2, p. 280-309, 2015. ISSN 1521-0081. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25697599>>.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 4 Suppl 3, p. S265-72, 2002. ISSN 1465-9905 (Print)1465-9905.

SILOSI, I. et al. Serum Biomarkers for Discrimination between Hepatitis C-Related Arthropathy and Early Rheumatoid Arthritis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, Jun 19 2017. ISSN 1422-0067.

SMITTEN, A. L. et al. A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 2, p. R45, 2008. ISSN 1478-6354.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, n. 5, p. 276-89, May 2015. ISSN 1759-4804. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687177>>.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023-2038, Oct 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156434>>.

SOLOMON, D. H. et al. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. **Circulation**, v. 107, n. 9, p. 1303-7, Mar 11 2003. ISSN 0009-7322.

SONG, Y. W.; KANG, E. H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. **QJM**, v. 103, n. 3, p. 139-46, Mar 2010. ISSN 1460-2393. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926660>>.

SRINIVAS, S. et al. Interferon-lambda1 (interleukin-29) preferentially down-regulates interleukin-13 over other T helper type 2 cytokine responses in vitro. **Immunology**, v. 125, n. 4, p. 492-502, Dec 2008. ISSN 0019-2805.

STAHL, E. A. et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. **Nat Genet**, v. 42, n. 6, p. 508-14, Jun 2010. ISSN 1061-4036.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocr Rev**, v. 28, n. 5, p. 521-74, Aug 2007. ISSN 0163-769X(Print)0163-769x.

SUN, J. et al. Diagnostic accuracy of combined tests of anti cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 32, n. 1, p. 11-21, 2014 Jan-Feb 2014. ISSN 0392-856X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050751>>.

SUZUKI, A.; YAMAMOTO, K. From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 33, n. 4 Suppl 92, p. S40-3, Jul-Aug 2015. ISSN 0392-856X (Print)0392-856x.

SUZUKI, K. et al. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 32, n. 4, p. 197-204, 2003. ISSN 0300-9742 (Print)0300-9742.

SWEDLER, W. et al. Routine measurement of IgM, IgG, and IgA rheumatoid factors: high sensitivity, specificity, and predictive value for rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 24, n. 6, p. 1037-44, Jun 1997. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

_____. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 23, p. 2205-19, Dec 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22150039>>.

_____. The Relationship of Cytokines IL-13 and IL-17 with Autoantibodies Profile in Early Rheumatoid Arthritis. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 3109135, 2016. ISSN 2314-7156.

TONG, L. et al. The eye: a window of opportunity in rheumatoid arthritis? **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 9, p. 552-60, Sep 2014. ISSN 1759-4790.

TROUW, L. A.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens--common principles. **Ann Rheum Dis**, v. 72 Suppl 2, p. ii132-6, Apr 2013. ISSN 0003-4967.

TURESSON, C. et al. Incidence and predictors of severe extra-articular disease manifestations in an early rheumatoid arthritis inception cohort. In: (Ed.). **Ann Rheum Dis**. England, v.66, 2007. p.1543-4. ISBN 0003-4967 (Print)0003-4967 (Linking).

UDALOVA, I. A. et al. Expression and immune function of tenascin-C. **Crit Rev Immunol**, v. 31, n. 2, p. 115-45, 2011. ISSN 1040-8401 (Print)1040-8401.

UYSAI, H. et al. Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. **J Exp Med**, v. 206, n. 2, p. 449-62, Feb 16 2009. ISSN 0022-1007.

VAN DEN HOOGEN, F. et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 11, p. 2737-47, Nov 2013. ISSN 0004-3591.

VAN LEEUWEN, M. A. et al. IgM, IgA, and IgG rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis predictive of radiological progression? **Scand J Rheumatol**, v. 24, n. 3, p. 146-53, 1995. ISSN 0300-9742 (Print)0300-9742.

VAN STEENBERGEN, H. W. et al. The effects of rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibodies on bone erosions in rheumatoid arthritis. In: (Ed.). **Ann Rheum Dis**. England, v.74, 2015. p.e3. ISBN 1468-2060 (Electronic)0003-4967 (Linking).

VAN STEENBERGEN, H. W.; VAN DER HELM-VAN MIL, A. H. Clinical expertise and its accuracy in differentiating arthralgia patients at risk for rheumatoid arthritis from other patients presenting with joint symptoms. **Rheumatology (Oxford)**, v. 55, n. 6, p. 1140-1, Jun 2016. ISSN 1462-0332. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742783>>.

VIVINO, F. B. Sjogren's syndrome: Clinical aspects. **Clin Immunol**, v. 182, p. 48-54, Sep 2017. ISSN 1521-6616.

VOGELPOEL, L. T. et al. Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. **Front Immunol**, v. 6, p. 79, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25759693>>.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. **Front Immunol**, v. 5, p. 511, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368616>>.

WANG, F. et al. Interleukin-29 modulates proinflammatory cytokine production in synovial inflammation of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 5, p. R228, Oct 2012. ISSN 1478-6362. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23078630>>.

WEGNER, N. et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 9, p. 2662-72, Sep 2010. ISSN 0004-3591.

WHITING, P. F. et al. Systematic review: accuracy of anti-citrullinated Peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 152, n. 7, p. 456-64; w155-66, Apr 06 2010. ISSN 0003-4819.

WITTE, K. et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 4, p. 237-51, Aug 2010. ISSN 1879-0305. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655797>>.

WOLFE, F. Comparative usefulness of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 24, n. 8, p. 1477-85, Aug 1997. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

WOLFE, F.; FREUNDLICH, B.; STRAUS, W. L. Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 30, n. 1, p. 36-40, Jan 2003. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. **Arthritis Rheum**, v. 33, n. 2, p. 160-72, Feb 1990. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2306288>>.

WU, Q. et al. Interferon-lambda1 induces peripheral blood mononuclear cell-derived chemokines secretion in patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 3, p. R88, Jun 2011. ISSN 1478-6362. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21679442>>.

XIE, Q.; HUANG, C.; LI, J. Interleukin-22 and rheumatoid arthritis: emerging role in pathogenesis and therapy. **Autoimmunity**, v. 48, n. 2, p. 69-72, Mar 2015. ISSN 1607-842X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483133>>.

XU, B.; LIN, J. Characteristics and risk factors of rheumatoid arthritis in the United States: an NHANES analysis. **PeerJ**, v. 5, p. e4035, 2017. ISSN 2167-8359. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29188142>>.

XU, D. et al. IL-29 Enhances LPS/TLR4-Mediated Inflammation in Rheumatoid Arthritis. **Cell Physiol Biochem**, v. 37, n. 1, p. 27-34, 2015. ISSN 1421-9778. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26278073>>.

XU, L. et al. Interleukin-29 induces receptor activator of NF- κ B ligand expression in fibroblast-like synoviocytes via MAPK signaling pathways. **Int J Rheum Dis**, v. 18, n. 8, p. 842-9, Nov 2015. ISSN 1756-185X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26420479>>.

YAMAMOTO, K. et al. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia--present and future. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, n. 6, p. 375-9, Jun 2015. ISSN 1759-4790.

ZENEWICZ, L. A.; FLAVELL, R. A. Recent advances in IL-22 biology. **Int Immunol**, v. 23, n. 3, p. 159-63, Mar 2011. ISSN 1460-2377. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21393631>>.

ZHANG, L. et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. **J Clin Immunol**, v. 31, n. 4, p. 606-14, Aug 2011. ISSN 1573-2592. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556937>>.

ZHAO, L. et al. IL-22+ CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. **Int J Rheum Dis**, v. 16, n. 5, p. 518-26, Oct 2013. ISSN 1756-1841.

ZHAO, M.; LI, Y.; XIAO, W. Anti-apoptotic effect of interleukin-22 on fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis is mediated via the signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway. **Int J Rheum Dis**, v. 20, n. 2, p. 214-224, Feb 2017. ISSN 1756-1841.

ZHENG, Y. et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. **Nat Med**, v. 14, n. 3, p. 282-9, Mar 2008. ISSN 1078-8956.

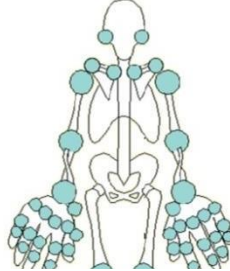
Annals of Medicine - Account Created in IANN's Scholar One site - laurindorochair@gmail.com - Gmail

Annals of Medicine - Account Created in IANN's Scholar One site

Se você fizer o login, será conectado ao Hangouts em todos os produtos do Google

Sincerely,

IDENTIFICAÇÃO			
2. Número da Ficha	3. Data de preenchimento	4. INICIAIS	5. Registro HC
6. Nome do paciente		7. Sexo 1. Masculino ☐ 2. Feminino ☐	
8. Data de Nascimento	9. Idade (anos)	10. Raça 1. Branca 4. Indígena ☐ 2. Negra 5. Amarela 3. Parda	
11. Endereço			
12. Telefone		13. Naturalidade/Procedência	
14. Ocupação:			
14.1 Em atividade 1. Sim 2. Não ☐ 14.2 Desempregado 1. Sim 2. Não ☐ 14.3 Em benefício 1. Sim 2. Não ☐			
15. Renda Familiar (soma dos moradores do mesmo domicílio) R\$		16. Escolaridade (anos estudados)	
17. CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO			
17.1 ACR 1987 ☐ 1. SIM 2. NÃO		17.2 ACR 2010 ☐ 1. SIM 2. NÃO	
17.1.1 ARTRITE DE MÃOS E PUNHOS ☐		17.2.1 ACOMETIMENTO ARTICULAR#: ☐	
17.1.2 ARTRITE SIMÉTRICA ☐		1G (00) 2-10G (01) 1-3P (02) 4-10P (03) >10 (05)	
17.2.2. SOROLOGIA: ☐		☐	
17.1.3 RIGIDEZ MATINAL > 1 HORA ☐		FR/ANTI-CCP*: AUSENTE (00) + (02) ++ (03)	
17.1.4 ARTRITE DE 3 OU + ARTICUL. ☐		17.2.3 REAGENTES DE FASE AGUDA: ☐	
17.1.5 FATOR REUMATOIDE ☐		PCR/VSH: NORMAL (00) ANORMAL (01)	
<6 SEMANAS (00) >6 SEMANAS (01)		17.2.4 DURAÇÃO DOS SINTOMAS: ☐	
17.1.6 ALTERAÇÕES RADIOGRÁFICAS ☐		17.2.5 TOTAL: ☐	
17.1.7 NÓDULOS SUBCUTÂNEOS ☐		# G: OMBROS, COTOVELOS, QUADRIL, JOELHOS, TORNOZELOS	
P: MCF, IFP DO 2º. Ao 5º., IF dos polegares, PUNHOS			
SOROLOGIA			
18. Fator reumatoide 1. Sim ☐ 2. Não ☐			
19. Anti-CCP 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 3. Não realizado ☐			
HISTÓRIA CLÍNICA			

20. Data do início dos sintomas ____ / ____ / ____ 21. Tempo de doença (sintomas em meses) 	22. Data do diagnóstico ____ / ____ / ____ 23. Tempo de doença (diagnóstico em meses) 										
24. Manifestações extra-articulares 1. Sim 2. Não 											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; padding: 2px;"> 25. Manifestações extra-articulares: 25.1 Pericardite () 25.2 Pleurite () 25.3. Vasculite cutânea () 25.4 Neuropatia relacionada a vasculite () </td> <td style="width: 33%; padding: 2px;"> 25.5 Síndrome de Felty () 25.6 Esclerite () 25.7 Episclerite () 25.8 Glomerulonefrite () 25.9 Amiloidose () </td> <td style="width: 33%; padding: 2px;"> 25.10 Síndrome de Sjogren () 25.11 Fibrose pulmonar () 25.12 Bronquiolite obliterante () 25.13 Nódulos reumatóides () 25.14 Ceratoconjuntivite seca () </td> </tr> </table>		25. Manifestações extra-articulares: 25.1 Pericardite () 25.2 Pleurite () 25.3. Vasculite cutânea () 25.4 Neuropatia relacionada a vasculite ()	25.5 Síndrome de Felty () 25.6 Esclerite () 25.7 Episclerite () 25.8 Glomerulonefrite () 25.9 Amiloidose ()	25.10 Síndrome de Sjogren () 25.11 Fibrose pulmonar () 25.12 Bronquiolite obliterante () 25.13 Nódulos reumatóides () 25.14 Ceratoconjuntivite seca ()							
25. Manifestações extra-articulares: 25.1 Pericardite () 25.2 Pleurite () 25.3. Vasculite cutânea () 25.4 Neuropatia relacionada a vasculite ()	25.5 Síndrome de Felty () 25.6 Esclerite () 25.7 Episclerite () 25.8 Glomerulonefrite () 25.9 Amiloidose ()	25.10 Síndrome de Sjogren () 25.11 Fibrose pulmonar () 25.12 Bronquiolite obliterante () 25.13 Nódulos reumatóides () 25.14 Ceratoconjuntivite seca ()									
26. Comorbidade? ☐ 1. SIM. ☐ 2. NÃO 26.1 Qual? _____											
27. Hipertensão arterial sistêmica? ☐ 1. SIM ☐ 2. NÃO Se a resposta for SIM:											
27.1 Faz uso de medicação anti-hipertensiva? ☐ 1. SIM ☐ 2. NÃO 28. Diabetes? ☐ 1. SIM ☐ 2. NÃO 29. Obesidade? ☐ 1. SIM ☐ 2. NÃO 30. Dislipidemia ☐ 1. SIM ☐ 2. NÃO 31. TABAGISMO? ☐ 1. SIM. ☐ 2. NÃO ☐ 3. Ex-Tabagista 31.1 Tempo: _____ anos 31.2 Inativo: _____ anos											
DADOS CLÍNICOS											
32. Peso: _____ 33. Altura: _____ 34. IMC: _____											
35. PAS: _____ 36. PAD: _____											
CONTAGEM ARTICULAR  											
ATIVIDADE DE DOENÇA											
48. CDAI: 48.1 Remissão () 48.2 Leve () 48.3 Moderada () 48.4 Severa ()	49. DAS28: 49.1 Remissão () 49.2 Leve () 49.3 Moderada () 49.4 Severa ()										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center;">50. Classe Funcional ()</th> <th style="width: 50%; text-align: center;">Definição</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">I</td> <td>Capacidade completa para realizar atividades comuns da vida diária (cuidado pessoal, trabalho, lazer)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">II</td> <td>Capacidade para realizar cuidados pessoais e trabalho, mas limitação para atividades de lazer e esportes</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">III</td> <td>Capacidade para realizar cuidados pessoais, mas limitação para trabalho e lazer</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">IV</td> <td>Limitação para todas as atividades usuais, inclusive cuidados pessoais e alimentação</td> </tr> </table>		50. Classe Funcional ()	Definição	I	Capacidade completa para realizar atividades comuns da vida diária (cuidado pessoal, trabalho, lazer)	II	Capacidade para realizar cuidados pessoais e trabalho, mas limitação para atividades de lazer e esportes	III	Capacidade para realizar cuidados pessoais, mas limitação para trabalho e lazer	IV	Limitação para todas as atividades usuais, inclusive cuidados pessoais e alimentação
50. Classe Funcional ()	Definição										
I	Capacidade completa para realizar atividades comuns da vida diária (cuidado pessoal, trabalho, lazer)										
II	Capacidade para realizar cuidados pessoais e trabalho, mas limitação para atividades de lazer e esportes										
III	Capacidade para realizar cuidados pessoais, mas limitação para trabalho e lazer										
IV	Limitação para todas as atividades usuais, inclusive cuidados pessoais e alimentação										

PRESENÇA DE EROSÕES:

1. SIM

☐

2. NÃO

☐**53. MEDICAMENTOS(Olhar também o prontuário):**

OBS.: (Marcar com X apenas o que estão sendo utilizados)

DROGA	ATUAL/DOSE	PREGRESSO
53.1 Prednisona		
53.2 Metotrexato		
53.3 Antimaláricos:		
53.4 Sulfassalazina		
53.5 Leflunomida		
53.6 Infliximabe		
53.7 Adalimumabe		
53.8 Etanercepte		
53.9 Rituximabe		
53.10 Abatacepte		
53.11 Tocilizumabe		
53.12 Vitamina D		
53.13 Estatinas		
53.14 Anti-hipertensivos		
53.15 AINE:		
53.16 OUTROS:		

EXAMES LABORATORIAIS

Hemograma: 54. Hb= 55. Ht = 56. Leuc = 57. Neutrófilos = 58. Linf = 59. Plaquetas =	60. LDL = 61. VLDL = 62. HDL = 63. Triglicerídeos = 64. Glicemia de Jejum = 65. Colesterol total =
66. Uréia 67. Creatinina =	68. TGO= 69. TGP=
70. Anti-CCP =	71. Fator Reumatóide = 71.1 1. NEGATIVO 2. + 3.++ (ALTOS TÍTULOS-3X)
72. Albumina=	73. PCR: 73.1 1.POSITIVO 2. NEGATIVO 3.NÃO REALIZADO

APENDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Biológicas / Centro de Ciências da Saúde
Grupo de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

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 ASPECTOS IMUNOBIOLOGICOS DA ARTRITE REUMATOIDE E BUSCA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS, que está sob a responsabilidade do pesquisador Laurindo Ferreira da Rocha Junior, Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420, telefone 81-21263576 e e-mail: laurindorochajr@hotmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Andrea Tavares Dantas, Laurindo Ferreira da Rocha Junior, Cláudia Diniz Lopes Marques, Henrique de Ataíde Mariz, Pablo Ramon Gualberto Cardoso, MichellyCristiny Pereira, Maria do Carmo Alves de Lima, Maira Galdino da Rocha Pitta, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego e Kamila de Melo Vilar. Telefones para contato: 21263575.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, 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 rubrique 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 nenhuma penalidade.

Como pesquisadores responsáveis deste estudo, nosso objetivo é descobrir o que está desregulado no seu corpo, levando ao desenvolvimento da doença. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue e/ou no líquido sinovial que é coletado da sua articulação no momento da administração do corticoide. Deste modo, nenhum medicamento será administrado em você durante toda a pesquisa.

É importante ressaltar que: sua participação é inteiramente **voluntária**, você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser, nós solicitaremos novamente sua aprovação (verbal) no momento de cada coleta, faremos um banco de dados e caso a pesquisa traga bons resultados, você será um dos primeiros beneficiados.

A artrite reumatoide é uma doença autoimune, inflamatória crônica que acomete, principalmente, as articulações, causando dores, deformidades e incapacidade funcional. Com o passar do tempo, os portadores de artrite desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades tanto de vida diária como profissional. A artrite reumatoide é comum e a prevalência pode chegar a 1,5% da população em algumas regiões. É mais freqüente em mulheres e costuma iniciar-se entre 30 e 50 anos de idade, mas também acomete homens e crianças.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é **portador de artrite reumatoide ou por você ser um voluntário não portador desta doença**. Este estudo inclui a participação de 500 indivíduos. Entre os quais, 300 são voluntários sem artrite reumatoide e 200 são portadores de artrite reumatoide.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). A coleta de sangue pode ser

desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

Para este estudo pode ser necessário coletar amostras do líquido sinovial. O líquido sinovial é um líquido transparente e viscoso de algumas juntas que tem como função lubrificar as articulações. Em pacientes com artrite reumatoide o líquido sinovial pode estar alterado em algumas articulações. O volume a ser coletado depende da quantidade de líquido que foi produzido na articulação com artrite. A coleta do líquido pode ser desconfortável e pode ser feita com ou sem anestésico local podendo ser necessário manter a articulação sem sobrecarga nas 24 horas após a coleta. Durante a coleta pode haver sangramento leve e/ou dolorimento. As coletas serão feitas por profissionais competentes devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente e quando necessárias guiadas por ultrassom. As coletas só serão realizadas nos pacientes na qual seja necessário a retirada do líquido sinovial para a administração do medicamento.

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 ficarão armazenados em pastas de arquivo no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE e computador pessoal dos pesquisadores envolvidos, sob a responsabilidade da pesquisadora Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contatar:

Profa. Dr. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, Médica do Hospital Das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: aduarte@terra.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 3454.0155.

Dr. Andrea Tavares Dantas, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: laurindorochajr@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 3454.0155.

Profa. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

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.

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).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Biológicas / Centro de Ciências da Saúde
Grupo de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

**« AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS IMUNOBIOLÓGICOS DA ARTRITE REUMATOIDE E BUSCA DE
NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS »**
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, 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: _____

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

IMPRESSÃO DIGITAL

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

Ângela Luzia Branco Pinto Duarte
(pesquisadora responsável)

ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 003/2011 - CEP/CCS

Recife, 14 de janeiro de 2011

Registro do SISNEP FR - 370323 .

CAAE – 0339.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 339/10

Título: Avaliação do perfil imunológico de pacientes portadores de artrite reumatoide.

Pesquisador Responsável: Maira Galdino da Rocha Pitta

Senhor(a) Pesquisador(a):

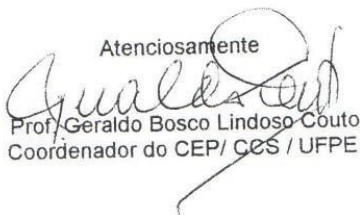
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 13 de janeiro de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

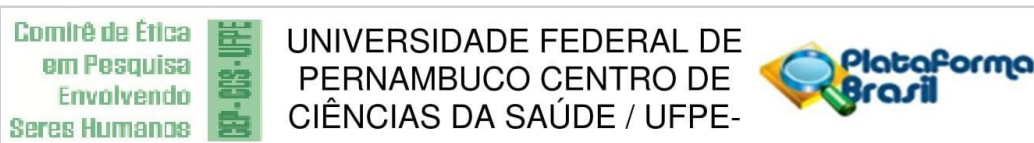
Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente



Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A
Prof.ª Maira Galdino da Rocha Pitta
Departamento de Bioquímica- CCB/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS IMUNOBIOLOGICOS DA ARTRITE REUMATOIDE E BUSCA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

Pesquisador: Laurindo Ferreira da Rocha Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53554116.6.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.486.537

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa sob a responsabilidade do pesquisador Laurindo Ferreira da Rocha Júnior (Médico, mestre e doutorando pelo Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) da UFPE) e uma grande equipe de pesquisadores, 12 ao todo. O projeto envolve a temática da artrite reumatoide (AR) doença sistêmica, inflamatória e progressiva, de etiologia autoimune, caracterizada pela presença de poliartrite periférica simétrica, às vezes associada a manifestações extra-articulares. Sua fisiopatologia é bastante complexa. Estudos genéticos e imunológicos indicam que a doença é consequente de um desequilíbrio tanto da imunidade inata quanto adaptativa. Citocinas inflamatórias e quimiocinas estão fortemente envolvidas na patogênese desta doença. O tratamento medicamentoso da AR inclui o uso de anti-inflamatórios não hormonais (AINH), corticoides, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas e biológicas e drogas imunossupressoras. Apesar de amplo espectro para tratamento da AR, novas drogas têm sido desenvolvidas com alvos terapêuticos direcionados a mecanismos moleculares específicos, particularmente em pacientes que apresentam eventos adversos importantes ou são refratários a terapia instituída. Diversos alvos terapêuticos na cascata inflamatória da AR tem sido continuamente identificados e

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:** cepccs@ufpe.br