



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GUSTAVO RAZENTE FASSINA

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DA REGIÃO  
PROMOTORA DO GENE *IL6* (RS1800795 E RS1800796) EM  
PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE:  
ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE  
CITOCINAS, ATIVIDADE DA DOENÇA E RESPOSTA  
TERAPÊUTICA**

---

Londrina  
2020

GUSTAVO RAZENTE FASSINA

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DA REGIÃO  
PROMOTORA DO GENE *IL6* (RS1800795 E RS1800796) EM  
PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE:  
ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE  
CITOCINAS, ATIVIDADE DA DOENÇA E RESPOSTA  
TERAPÊUTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Co-orientadora: Profa. Dra. Neide Tomimura Costa

Londrina  
2020

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

F249 Fassina, Gustavo Razente.

Avaliação das variantes genéticas da região promotora do gene *IL6* (rs1800795 e rs1800796) em pacientes com espondilite anquilosante: Associação com os níveis plasmáticos de citocinas, atividade da doença e resposta terapêutica / Gustavo Razente Fassina. - Londrina, 2020.  
86 f. : il.

Orientador: Andréa Name Colado Simão.

Coorientador: Neide Tomimura Costa.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Espondilite Anquilosante - Tese. 2. rs1800795 - Tese. 3. rs1800796 - Tese. 4. Inibidores de TNF- $\alpha$  - Tese. I. Simão, Andréa Name Colado . II. Costa, Neide Tomimura. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 61

GUSTAVO RAZENTE FASSINA

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DA REGIÃO  
PROMOTORA DO GENE *IL6* (RS1800795 E RS1800796) EM  
PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE:  
ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS,  
ATIVIDADE DA DOENÇA E RESPOSTA TERAPÊUTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Name Colado  
Simão  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edna Maria Vissoci Reiche  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roberta Losi Guembaroviski  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de janeiro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a meus pais, que sempre me guiaram e se dedicaram tanto para que eu pudesse me realizar profissionalmente. Sem vocês não chegaria até aqui.

Agradeço à minha orientadora Profa Dra Andréa Name Colado Simão não só pela constante orientação e dedicação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, paciência, carinho e incentivo sempre.

À minha co-orientadora Dra Neide Tomimura Costa, por toda dedicação, disponibilidade e ajuda durante esta caminhada, além do incentivo constante a trilhar este caminho.

Gostaria de agradecer também a todos os colegas do setor de imunologia clínica do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário de Londrina que tanto colaboraram para a realização deste trabalho.

Por fim, aos pacientes que tornaram possível esse trabalho por sua colaboração e paciência, minha eterna gratidão.

FASSINA, Gustavo Razente. **Avaliação das variantes genéticas da região promotora do gene *il6* (rs1800795 e rs1800796) em pacientes com espondilite anquilosante:** associação com os níveis plasmáticos de citocinas, atividade da doença e resposta terapêutica. 2020. 83 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença crônica imunomediada caracterizada por inflamação do esqueleto axial. A etiologia da EA é desconhecida, mas acredita-se envolver uma combinação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais. As vias que envolvem as interleucina-6 (IL-6), interleucina-17 (IL-17) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) contribuem, principalmente, para a progressão da EA. As variantes do *IL6* -174 G>C (rs1800795) e -572 G>C (rs1800796) podem alterar os níveis plasmáticos da IL-6 e contribuir para a suscetibilidade e parâmetros clínicos na EA. Além disso, podem ser um marcador genético que prediz o resultado do tratamento com inibidor de TNF- $\alpha$ . **OBJETIVO:** avaliar as variantes -174 G>C e -572 G>C do *IL6*, individualmente e haplótipos, e sua associação com suscetibilidade, níveis plasmáticos de citocinas, índices funcionais e de atividade de doença, e resposta terapêutica ao tratamento com inibidores de TNF- $\alpha$ . **SUJEITOS E MÉTODOS:** Este estudo prospectivo de caso-controle incluiu 212 indivíduos. Oitenta e oito pacientes diagnosticados com EA foram recrutados consecutivamente na Clínica de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina e 124 controles sem EA (HC). O diagnóstico de EA foi confirmado de acordo com os critérios de Nova York modificados. Foram avaliados o Índice de Atividade de Doença da Espondilite Anquilosante de Bath (BASDAI) e o Índice Funcional de Espondilite Anquilosante de Bath (BASFI). Os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17A foram determinados por imunofluorimetria. O Antígeno Leucocitário Humano (HLA)-B27 foi determinado por reação em cadeia da polimerase (PCR). As variantes do gene *IL6* (rs1800795 e rs 1800796) foram genotipadas por ensaio de discriminação alélica pelo sistema de PCR em tempo real (qPCR). Foi analisado, também, uma coorte incluindo cinquenta e quatro pacientes (n=54) com EA tratados com inibidores de TNF- $\alpha$  (infliximabe, adalimumabe ou etanercepte) foram acompanhados 12 meses após o início do tratamento. Dois subgrupos de pacientes com EA foram distinguidos: respondedores (n = 43) e não respondedores (n = 11) à terapia com inibidores do TNF- $\alpha$ . Foi considerada falha terapêutica ao uso do primeiro inibidor de TNF- $\alpha$  quando, após 12 meses de tratamento, o paciente apresentava BASDAI $\geq$ 4. **RESULTADOS:** Os grupos não diferiram quanto à frequência dos alelos e genótipos da variante -174G>C. No entanto, o alelo C da variante -572G>C foi menos frequente nos pacientes com EA (4,0%) quando comparado ao grupo HC (13,7%) [Odds ratio (OR): 0,282; intervalo de confiança (CI) 95%: 0,112-0,706; p = 0,007]. O genótipo GC foi associado à proteção para EA (OR: 0,339; CI95%: 0,129-0,889; p = 0,028). O haplótipo dominante C/G (rs1800796 / 1800795) foi associado à EA (OR = 0,297, CI 95% 0,112 - 0,787, p= 0,015), ajustado para idade e índice de massa corporal. No entanto, não houve associação entre genótipos/ haplótipos e níveis plasmáticos de IL-6, IL-17A e TNF- $\alpha$  em pacientes HC e pacientes com EA. Também não houve associação entre genótipos/ haplótipos e BASDAI e BASFI. As variantes do *IL6*, individualmente ou em haplótipo, também não foram associadas ao sucesso

terapêutico com o primeiro inibidor de TNF- $\alpha$  após 12 meses de tratamento.  
**CONCLUSÃO:** Nossos resultados demonstraram que o genótipo GC da variante -572 G>C (rs1800796) do *IL6* e os haplótipos C/G em modelo dominante foram associados à proteção para EA. No entanto, as variantes -174 G>C e -572 G>C do *IL6*, individualmente ou em haplótipo, não foram associadas aos níveis plasmáticos de citocinas (IL-6, IL-17A e TNF- $\alpha$ ), índice funcional e de atividade de doença e a resposta terapêutica ao uso de inibidores de TNF- $\alpha$ .

**Palavras-chave:** Espondilite Anquilosante. rs1800795. rs1800796. Citocinas. Inibidores de TNF- $\alpha$ .

FASSINA, Gustavo Razente. **Evaluation of genetic variants of il6 gene promoting region (rs1800795 and rs1800796) in patients with ankylosing spondylitis: Association with cytokines plasma levels, activity of disease and tumoral necrosis factor alpha inhibitors treatment.** 2020. 83 p. Dissertation (Master's Degree in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Ankylosing spondylitis (AS) is a common chronic immune-mediated disease characterized by inflammation of the axial skeleton. The etiology of AS is unknown but is believed to involve a combination of genetic, immunologic, and environmental factors. Pathways involving interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17) and tumoral necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) are suspected to contribute majorly to AS progression. The -174 G>C (rs1800795) and -572 G>C (rs1800796) *IL6* variants could alter IL-6 plasma levels and could contribute to susceptibility and clinical parameters of AS. Moreover, variants could be a genetic marker predicting the outcome of TNF- $\alpha$  inhibitor treatment. **OBJECTIVE:** to evaluate -174 G>C and -572 G>C *IL6* variants, individually and haplotype, and their association with susceptibility, cytokine plasma levels, functional and activity disease index, and therapeutic response to TNF- $\alpha$  inhibitors treatment. **SUBJECTS AND METHODS:** This is a prospective case-control study that included 212 subjects. Eighty eight patients with AS diagnosed were consecutively recruited from the Rheumatology Clinic of the University Hospital of Londrina and 124 controls without AS (HC). Diagnosis of AS was confirmed according to modified New York criteria. Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) were evaluated. IL-6, IL-17A and TNF- $\alpha$  plasma levels were evaluated by immunofluorimetry. Human leukocyte antigen (HLA)-27 was determined by polymerase chain reaction (PCR). The *IL6* variants (rs1800795 e rs1800796) were genotyped by allelic discrimination assay on real time PCR (qPCR). Fifty four AS patients treated with infliximab, adalimumab or etanercept were followed up for 12 months after the treatment beginning. Two subgroups of AS patients were then distinguished: responders (n=43) and non-responders (n=11) to TNF- $\alpha$  inhibitors therapy. It was considered therapeutic failure the use of the first TNF- $\alpha$  inhibitor when after 12 months of treatment the patient had BASDAI $\geq$ 4. **RESULTS:** The groups did not differ about allele and genotype frequency of -174 G>C variant. However, C allele of -572 G>C *IL6* variant was less frequent in AS patients (4.0%) when compared to HC group (13.7%) (OR:0.282; 95%CI: 0.112-0.706; p=0.007). The GC genotype was associated with protection to AS (OR: 0.339; 95%CI: 0.129-0.889; p=0.028). C/G (rs1800796/1800795) dominant haplotype was associated with AS (OR=0.297, 95% CI 0.112-0.787, p=0.015), controlling by age, and BMI. However, there was no association between genotypes/haplotype and IL-6, IL-17, and TNF- $\alpha$  plasma levels in HC and AS patients. In addition, there was no association between genotypes/haplotype and BASDAI and BASFI. *IL6* variants, individually or in haplotype, were not also associated with therapeutic success with the first TNF- $\alpha$  inhibitor used after 12 months of treatment. **CONCLUSION:** Our results demonstrated that GC genotype of -572 (rs1800796) of *IL6* variant and haplotypes (C/G) in dominant model were associated with protection to AS. However, the variants -174 G>C and -572 G>C of *IL6*, individually or in haplotype, were not

associated with cytokine plasma levels, functional and activity disease index, and TNF- $\alpha$  inhibitor treatment.

**Key words:** Ankylosing spondylitis. rs1800795. rs1800796. Cytokines. TNF- $\alpha$  inhibitor.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
APC	Células apresentadoras de antígenos
APso	Artrite psoriásica
AR	Artrite reumatoide
ASAS	Assessment of SpondyloArthritis international Society
ASDAS	Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score
ASDAS-PCR	Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score – PCR
AVC	Acidente vascular cerebral
BASDAI	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI	Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BASMI	Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index
CDAI	Clinical Disease Activity Index
DAS 28	Disease Activity Score 28
EA	Espondilite Anquilosante
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EpA	Espondiloartrite
EpAax	Espondiloartrite axial
EpA-axNrx	Espondiloartrite axial não radiográfica
EpA-axrx	Espondiloartrite axial radiográfica
EpAp	Espondiloartrites periféricas
ERAP1	Retículo endoplasmático aminopeptidase 1
ERAP2	Retículo endoplasmático aminopeptidase 2
EVA	Escala Visual Analógica
HLA	Human leukocyte antigen (Antígeno Leucocitário Humano)
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-23R	Receptor de interleucina 23
ILs	Interleucinas
IMC	Índice de massa corporal
LD	Desequilíbrio de ligação por pares
LES	Lupus eritematoso sistêmico

MASES	Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score
MHC	Major histocompatibility complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MMP	Metaloproteinase de matrix
MMP-3	Metaloproteinase de matrix 3
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células natural killers
OPG	Osteoprotegerina
OR	Odds ratio (Razão de chances)
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCR	Proteína C Reativa
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B)
RE	Retículo endoplasmático
RNM	Ressonância nuclear magnética
SCA1+	Stem cell antigen 1-positive (Antígenos de células tronco 1 positivo)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo simples)
SNV	Single nucleotide variant (Variantes de um único nucleotídeo)
SOFA	Sepsis-related organ failure assessment
sTNF	Fator de necrose tumoral solúvel
sTNF-R1	Receptor 1 de fator de necrose tumoral solúvel
sTNF-R2	Receptor 2 de fator de necrose tumoral solúvel
TCAR	Tomografia de tórax de alta resolução
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	Fator transformador do crescimento beta
Th	T helper
Th0	Célula T naive
tmTNF	Fator de necrose tumoral transmembrana
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1)
TNFR2	Receptor 2 do fator de necrose tumoral (TNFR2)

TNFR $\beta$	Receptor da linfotoxina beta
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha (Fator de necrose tumoral alfa)
Treg	Células T regulatórias
UAA	Uveíte anterior aguda
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UPR	Resposta proteica desdobrada
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VHS	Velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	ESPONDILITE ANQUILOSANTE .....	14
1.1.1	Aspectos Clínicos da EA .....	15
1.1.2	Diagnóstico da EA .....	17
1.1.3	Fisiopatologia da EA .....	19
1.1.4	Tratamento da EA.....	24
1.1.5	Estudos que Avaliaram Citocinas em EPA.....	26
1.1.6	Variantes Genéticas do IL6 .....	29
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	36
3.1	OBJETIVO GERAL .....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>4</b>	<b>SUJEITOS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	37
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM .....	37
4.3	EXAMES LABORATORIAIS .....	38
4.3.1	Determinação do HLA-B27 e dos Níveis Plasmáticos de Citocinas .....	38
4.3.2	Variantes Genéticas do IL6 (Rs1800795 E Rs1800796) .....	38
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	65
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	66
	<b>ANEXOS</b> .....	73

ANEXO A - Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Índice (BASMI).....	73
ANEXO B - Bath Ankylosing Spondylitis Activity Index (BASDAI) .....	74
ANEXO C - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS).....	75
ANEXO D - The Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI).....	76
ANEXO E - Recomendação ASAS-EULAR 2016 para o manejo da espondiloartrite axial.....	77
ANEXO F - Fluxograma de tratamento da espondilite anquilosante protocolo de diretrizes clínica e terapêuticas.....	78
ANEXO G - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL.....	79
<b>APÊNDICES</b> .....	81
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	81
APÊNDICE B - Ficha de avaliação dos pacientes com espondiloartrites .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

As espondiloartrites (EpAs) são um grupo de doenças inflamatórias crônicas que compartilham características clínicas e genéticas. Classificam-se de acordo com o envolvimento articular predominante em: espondiloartrites axiais (EpAax), que englobam espondiloartrite axial não radiográfica (EpA-axNrx) e espondiloartrite axial radiográfica (EpA-axrx), também conhecida como espondilite anquilosante (EA); e espondiloartrites periféricas (EpAp), que incluem artrite psoriásica (APso), artrite relacionada a doença inflamatória intestinal e artrite reativa. O termo EpA-axNrx é utilizado para descrever a fase inicial da doença, quando não há lesões detectáveis na radiografia simples das articulações sacroilíacas. Nestes casos, a ressonância nuclear magnética (RNM) das articulações sacroilíacas possibilita a visualização do processo inflamatório e achados precoces de erosão e esclerose óssea. O conceito de EPAax também implica que nem todos os pacientes progredirão para a EA (HEALY; HELLIWELL, 2005). Já as EpAp acometem predominantemente articulações periféricas, de modo assimétrico e oligoarticular, ênteses periféricas e, em menor frequência, pode cursar com dactilite, que é a inflamação do tendão flexor de um ou mais dedos, bainha e acentuado envolvimento adjacente dos tecidos moles (RUDWALEIT et al., 2011).

Houve um avanço considerável na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas EpAs nas últimas duas décadas, o que levou ao desenvolvimento de novos conceitos e critérios de classificação para este grupo de doenças. Em 1974, Moll e colaboradores propuseram, pela primeira vez, o termo espondiloartropatias soronegativas, que englobava um grupo de doenças com características clínicas, sorológicas, radiológicas e genéticas em comum: teste negativo para fator reumatoide; ausência de nódulos (reumatoides) subcutâneos; artrite inflamatória periférica; sacroiliíte inflamatória, com ou sem achados clássicos de EA e tendência a exibir relação clínica e sobreposição entre membros de um grupo (MOLL et al., 1974). Posteriormente, o termo soronegativa foi suprimido, passando a ser utilizada apenas a denominação espondiloartropatia (BRAUN e SIEPER, 2002). Em 2009, o grupo *Assessment of SpondyloArthritis International Society* (ASAS) introduziu o conceito de EpAs, que incluía: EA, APso, uveíte anterior aguda (UAA), artrite reativa, artrite enteropática, EpA juvenil e EpA

1 indiferenciada (KHAN; VAN DER LINDEN, 1990 e ZEIDLER; CALIN; AMOR, 2011).  
2 Em 2011, foi publicado o conceito de EpA cujos critérios de classificação são  
3 utilizados atualmente (RUDWALEIT et al., 2011).

4

#### 5 1.1 ESPONDILITE ANQUILOSANTE

6

7 A EA é considerada o protótipo das EpA, sendo uma artrite inflamatória axial  
8 potencialmente debilitante (ZOCHLING; SMITH, 2010) na qual 80 a 95% dos  
9 pacientes apresentam positividade para marcador genético Antígeno Leucocitário  
10 Humano (HLA) B27 (DUBA; MATHEW, 2018).

11 A prevalência de EA depende do grupo étnico em estudo, da seleção dos  
12 sujeitos para avaliação e dos critérios de classificação. Também existe uma  
13 associação clara entre a prevalência da EA e de HLA-B27 em uma determinada  
14 população. Em geral, 5 a 6% dos indivíduos portadores do alelo HLA-B27 têm EA  
15 (REVEILLE; WEISMAN, 2013). Nos Estados Unidos a prevalência do HLA-B27 varia  
16 entre 1,1% a 7,5% entre as diferentes comunidades étnicas (REVEILLE et al., 2012).  
17 Por outro lado, a prevalência de EA é estimada no mundo entre 0,7 a 49 por 10.000  
18 habitantes, sendo as prevalências médias na América do Norte 31,9, na Europa de  
19 23,8, na Ásia 16,7, na América Latina 10,2 e na África 7,4 indivíduos com EA por  
20 10.000 habitantes (DEAN et al., 2014). Tipicamente afeta mais homens que  
21 mulheres na proporção de três para um (3:1); porém, quando considera-se a EpA-  
22 axNrx a proporção é semelhante (WINTER et al., 2016).

23 O risco de EA está aumentado em parentes de pacientes afetados,  
24 principalmente dos que carregam o alelo HLA-B27. Estudos realizados em gêmeos  
25 monozigóticos demonstraram risco de 63%, de 8,2% em parentes de primeiro grau,  
26 de 1% nos de segundo grau, de 0,7% nos de terceiro grau e de 7,9% entre pais e  
27 filhos (BROWN et al., 2000). No entanto, estudos familiares e entre gêmeos sugerem  
28 que somente o HLA-B27 pode explicar menos de 30% do risco para EA (BROPHY et  
29 al., 2004).

30

### 1 1.1.1 Aspectos Clínicos das EA

2  
3 Geralmente a dor lombar inicia-se antes dos 45 anos, de forma insidiosa,  
4 crônica (mais que três meses), sendo pior no início da manhã, associada a rigidez  
5 matinal maior que 30 minutos. Caracteristicamente, apresenta ritmo inflamatório, ou  
6 seja, é aliviada pela atividade (mobilização) e agravada pelo repouso. Tende a ser  
7 pior durante a noite, levando o paciente a se levantar e caminhar para obter o alívio.  
8 A resposta ao uso de anti-inflamatório não esteroidal (AINE) costuma ser satisfatória.  
9 Pode ocorrer, também, o acometimento cervical mais tardiamente (TAUROG;  
10 CHHABRA; COLBERT, 2016). De acordo com os critérios estabelecidos pelo ASAS,  
11 o paciente deve apresentar, pelo menos, quatro dos cinco critérios para considerar  
12 como uma dor lombar inflamatória: idade de início antes dos 40 anos; início  
13 insidioso; melhora com o exercício; piora com o repouso; dor à noite (com melhora  
14 ao levantar-se) (COLLANTES-ESTEVEZ et al., 2009).

15 Os ombros e quadris são considerados articulações axiais e seu envolvimento  
16 ocorre em até 50% dos pacientes, sendo mais comum que o acometimento  
17 periférico. Nos quadris, pode haver deformidades progressivas em flexão e  
18 destruição articular (SIEPER et al., 2002). Nos ombros, pode haver estreitamento do  
19 espaço articular e alterações erosivas, com eventual anquilose. Também pode se  
20 observar lacerações crônicas de manguito rotador (JENNINGS; LAMBERT;  
21 FREDERICSON, 2008). Já a artrite periférica costuma manifestar-se como  
22 oligoartrite assimétrica que predomina em membros inferiores, mais comum em  
23 tornozelos, quadril, joelhos, ombros e articulações esternoclaviculares (SAMPAIO-  
24 BARROS et al., 2001).

25 Outra manifestação clínica importante são as entesites. A êntese é a região  
26 onde insere-se o tendão, ligamento, cápsula ou fáscia no osso. Denomina-se  
27 entesite a inflamação nesta área, manifestando-se como dor, rigidez e sensibilidade  
28 (SIEPER et al., 2002). Foi desenvolvida a escala *Maastricht Ankylosing Spondylitis*  
29 *Enthesitis Score* (MASES), que é um instrumento de avaliação para quantificar o  
30 número de entesites, pela palpação dos principais sítios de envolvimento sem  
31 graduação da intensidade de dor: primeira e sétima articulação costoesternais  
32 bilateral, espinhas ilíacas ântero-superior e póstero-superior da crista ilíaca bilateral,  
33 borda superior da crista ilíaca bilateral, processo espinhal da quinta vértebra lombar,

1 ponto de inserção de tendão de Aquiles bilateral (ANEXO A) (HEUFT-  
2 DORENBOSCH et al., 2003).

3 A manifestação extra-articular mais comum da EA é a UAA. Ocorre em 30 a  
4 40% dos casos e 90% deles são pacientes com HLA-B27 positivo. Geralmente, a  
5 uveíte é unilateral, tem início abrupto, podendo ser recorrente. Os sintomas são  
6 rubor, dor, visão borrada e fotofobia. O diagnóstico exige avaliação especializada  
7 oftalmológica (ZEBOULON; DOUGADOS; GOSSEC, 2008). Outra manifestação  
8 extra-articular presente em aproximadamente 50% dos pacientes com EA e EpA-  
9 axNrx é o acometimento da mucosa ileal e colônica demonstrada histologicamente,  
10 mas geralmente assintomática (JACQUES et al., 2012). Já a psoríase apresenta  
11 uma prevalência de 10% em pacientes com EA e EpA-axNrx. Nestes pacientes há  
12 maior frequência de articulações periféricas envolvidas e um acometimento axial  
13 mais agressivo quando comparado às EpAax (WINTER et al., 2016; PÉREZ  
14 ALAMINO et al., 2011).

15 Assim como na artrite reumatoide (AR), os pacientes com EA apresentam  
16 elevado risco cardiovascular, sendo de 30 a 50% maior que a população geral em  
17 relação à eventos coronariano, cerebrovascular e tromboembolismo (ERIKSSON et  
18 al., 2017). Entre as manifestações cardíacas, podem ocorrer anormalidades de  
19 condução, que são as mais comuns, e acometimento valvar, classicamente descrito  
20 como aortite e regurgitação aórtica (ERIKSSON et al., 2017).

21 O envolvimento pulmonar é também reconhecido como manifestação extra-  
22 articular da EA, com prevalência que varia de zero a 30%. A manifestação típica é a  
23 fibrose do lobo superior, presente em 6,9%. As manifestações mais comuns  
24 descritas na tomografia de tórax de alta resolução (TCAR) são bandas  
25 parenquimatosas (45%), espessamentos da parede brônquica (30%) e  
26 espessamento pleural (52%) (EL MAGHRAOUI; DEHHAOUI, 2012).

27

1 1.1.2 Diagnóstico da EA

2

3 Em 1984, foi proposto um conjunto de critérios para o diagnóstico de EA. O  
4 quadro 1 demonstra os parâmetros clínicos e radiológicos utilizados pelos “Critérios  
5 Modificados de Nova York”.

**Quadro 1 - Critérios modificados de Nova York para Espondilite Anquilosante.**

**Critérios clínicos**

1. Dor lombar e rigidez por mais de 3 meses que melhora com o exercício, mas que não é aliviada pelo repouso
2. Limitação do movimento da coluna lombar tanto no plano lateral quanto frontal
3. Limitação da expansão torácica em relação aos valores normais corrigidos pela idade e sexo

**Critério radiológico**

Sacroiliíte de grau  $\geq 2$  bilateral ou de grau 3 a 4 unilateral

**Espondilite anquilosante definitiva**

O Critério radiológico está associado a pelo menos um critério clínico

**Fonte:** LINDEN & VALKENBURG (1984).

6 Em 2009, a ASAS propôs um novo critério de classificação para EpAax  
7 (Quadro 2). Com a disseminação da RNM, foi possível estabelecer diagnóstico mais  
8 precoce, visualizar a sacroiliíte aguda antes das alterações na radiografia  
9 convencional. Uma vez que a lesão estrutural definitiva não fosse radiograficamente  
10 visível neste estágio, foi proposto a denominação EpA-axNrx (RUDWALEIT et al.,  
11 2009).

12

1 **Quadro 2** - Critérios de classificação da ASAS para espondiloartrite axial.

Em pacientes com dor lombar $\geq$ 3 meses e idade de início $<$ 45 anos	
Sacroiliíte nas imagens *  mais  $\geq$ uma característica de EPA**	ou
	HLA-B27  Mais  $\geq$ duas outras características de EPA**
<b>** Característica da EPA:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dor lombar inflamatória</li> <li>• Artrite</li> <li>• Entesite (calcanhar)</li> <li>• Uveíte</li> <li>• Dactilite</li> <li>• Psoríase</li> <li>• Doença de Crohn/ colite ulcerativa</li> <li>• Boa resposta AINE</li> <li>• História familiar de EpA</li> <li>• HLA-B27</li> <li>• Elevação PCR</li> </ul>	<b>* Sacroiliíte nas imagens:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflamação ativa (aguda) à RNM altamente sugestiva de sacroiliíte associada à EPA</li> </ul>
	ou
	Sacroiliíte radiográfica definida de acordo com os critérios de Nova York modificados
Sensibilidade de 82%, especificidade de 84,4%; n=649 pacientes com dor lombar crônica e idade de início $<$ 45 anos. Os critérios de imagens (sacroiliíte) isoladamente apresentam sensibilidade de 66,2% e especificidade de 97,3%. ** Nota: A elevação da PCR é considerada uma característica da EpA no contexto de dor lombar crônica.	

Critérios de avaliação da ASAS aprovados para a classificação de pacientes com EpAax, para serem aplicados aos pacientes com um diagnóstico de EpAax, idade de início menos que 45 anos e dor lombar crônica. Os pacientes podem ser classificados por meio de critérios de imagens de sacroiliíte nas radiografias ou RNM, além de pelo menos uma característica adicional de EPA, ou por critérios clínicos com positividade para HLA-B27 mais, no mínimo, duas características adicionais de EpA. PCR, proteína C reativa; RNM, imagens de ressonância nuclear magnética; AINE, anti-inflamatório não esteroidal. ASAS - *SpondyloArthritis International Society*; EpAax - Espondiloartrite Axial; EpA – espondiloartrite, RNM – Ressonância Nuclear Magnética.

**Fonte:** Adaptado coleção ASAS de slides. Disponível em <<http://www.asas-group.org>>. Acesso em: 17 out. 2019.

2

3 Alguns índices foram criados para monitorar a atividade da doença em  
 4 pacientes com EA. O instrumento *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*  
 5 (BASDAI) avalia seis itens: fadiga, dor axial, dor periférica, entesite, duração e  
 6 intensidade da rigidez matinal. O valor é obtido pela soma dos valores de uma  
 7 escala visual analógica (EVA) para cada item, e a intensidade e rigidez matinal é  
 8 somado a média das duas, o resultado é então dividido por cinco. Os pacientes com

1 BASDAI  $\geq 4$  são considerados em atividade (ANEXO B) (GARRET et. al,1994). Um  
2 outro instrumento para avaliação da atividade é o *Ankylosing Spondylitis Disease*  
3 *Activity Score* (ASDAS). Sua vantagem em relação ao BASDAI é que, além de  
4 perguntas subjetivas, incrementa na sua análise exames objetivos como velocidade  
5 de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa (PCR), além de categorizar a  
6 atividade de doença em inativa ( $<1,3$ ), moderada ( $1,3 - <2,1$ ), elevada ( $2,1 - \leq 3,5$ )  
7 ou muito elevada ( $> 3,5$ ). Como desvantagem, há a necessidade de uso de  
8 calculadora específica (ANEXO C) (MACHADO et al., 2011).

9 Já para avaliação da função de habilidade para realizar tarefas foi criado o  
10 instrumento *Bath Ankylosing Spondylitis Funcional Index* (BASFI). Consiste em dez  
11 questões, sendo oito associadas a capacidade funcional dos pacientes e duas  
12 relativas a integração do com a vida diária. Assim como no BASDAI, é usada uma  
13 EVA de zero a dez centímetros, sendo no zero a marcação da palavra fácil e em 10  
14 cm a palavras impossível, o resultado é dado pela média aritmética de cada questão  
15 (ANEXO D) (CUSMANICH; KOWALSKI; GALLINARO, 2012; SHINJO;  
16 GONÇALVES; GONÇALVES, 2006) .

17

### 18 1.1.3 Fisiopatologia da EA

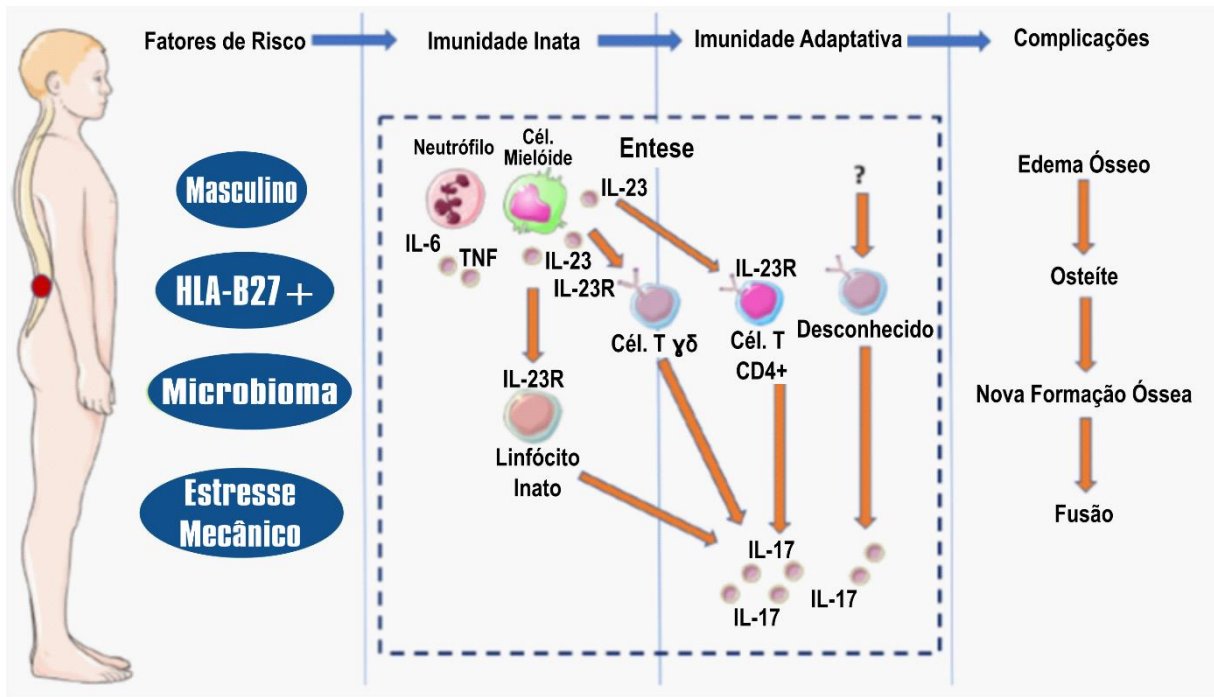
19

20 A etiologia da EA é multifatorial e ainda não está completamente elucidada,  
21 mas sabe-se que uma complexa interação entre fatores genéticos, especialmente o  
22 alelo HLA-B27, e fatores ambientais como o estresse mecânico e o microbioma  
23 estão envolvidos (WATAD et al., 2018); (SIMONE; AL MOSSAWI; BOWNESS,  
24 2018).

25 As EpAs não apresentam características chaves de doença autoimune  
26 causada por linfócitos T ou B autorreativos; ao contrário, apresentam características  
27 de doença autoinflamatória, predominando o sistema imune inato em sítios  
28 específicos da doença, em que diferentes formas de estresse celular levam a  
29 inflamação exagerada e descontrolada induzindo inflamação crônica do tecido  
30 (BRIDGEWOOD et al., 2018). Desta forma, as citocinas produzidas inicialmente pela  
31 resposta imune inata tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina

1 (IL)-6 e IL-17, cuja a produção é intensificada pela resposta imune adaptativa têm  
2 papel fundamental na fisiopatologia da EA (figura 1).

3 **Figura 1:** Fisiopatologia da Espondilite Anquilosante.  
4



5

6 Diferentes fases da imunopatogênese da EA. A interação entre diferentes componentes considerados  
7 como fatores de risco para EA leva à desregulação da imunidade inata nas enteses da coluna  
8 vertebral e outros ossos sub-fibrocartilagosos. A secreção local de IL-23 e ativação de células  
9 linfóides inatas e, posteriormente, desregulação da imunidade adaptativa com ativação de células  
10 imunológicas positivas para IL-23R, como células T  $\gamma\delta$  e outras células desconhecidas que liberam IL-  
11 17, o que resulta em efeitos de remodelação, incluindo edema ósseo, osteíte, nova formação óssea e,  
12 em alguns casos, fusão da coluna.

13 IL-6: Interleucina 6. TNF: Fator de Necrose Tumoral. IL-23: Interleucina 23. IL-23R: Receptor de  
14 interleucina 23. Cél. T  $\gamma\delta$ : Células T gama delta. Cél T CD4+: Células T CD4+.

15 **Fonte:** Adaptado Watad et al. (2018).

16 Aproximadamente 20% do risco de herdabilidade da EA está associado às  
17 variantes do HLA ou Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), sendo o  
18 HLA-B27 o maior contribuinte e com cerca de 7% do risco relacionados a variantes  
19 genéticas não MHC (SAVAGE et al., 2010; REVEILLE, 2012). A associação com o  
20 HLA-B27 foi reconhecida em 1973 (BREWERTON et al., 1973) e dentre aqueles  
21 associados à EA, os mais comuns são o HLA-B\*2705 e HLA-B\*2704 enquanto os  
22 subtipos HLA-B\*2706 e HLA-B\*2709 não foram associados as EpA (REVEILLE,  
23 2009).

24 Apesar de existirem vários estudos relacionando o alelo *HLA-B27* com a EA, o  
25 mecanismo patogênico do HLA-B27 permanece incerto. Quatro teorias principais

1 poderiam explicar o papel do HLA-B27 na EA: 1) a teoria dos peptídeos  
2 artritogênicos, 2) a hipótese do mau desdobramento do HLA-B27, 3) a hipótese dos  
3 homodímeros de superfície e 4) HLA-B27 e microbioma. A teoria dos peptídeos  
4 artritogênicos propõe que o HLA-B27 desempenha um papel patogênico central na  
5 apresentação de peptídeos específicos da articulação às células TCD8<sup>+</sup>. Propõe-se  
6 que peptídeos específicos se liguem e sejam apresentados pelo HLA-B27, para  
7 ativar células T CD8<sup>+</sup>, porém nenhum peptídeo artritogênico convincente foi  
8 identificado até o momento na EA. A segunda hipótese deriva da observação de  
9 que o HLA-B27 pode se desdobrar no retículo endoplasmático (RE). Esse  
10 desdobramento leva ao estresse do ER, que ativa uma resposta proteica  
11 desdobrada (UPR), levando à regulação positiva da IL-23 nas células dendríticas. A  
12 terceira teoria refere-se à capacidade do HLA-B27 de dobrar-se aberrantemente  
13 para formar homodímeros ou cadeias pesadas sem a presença de beta-2-  
14 microglobulina na superfície celular. Formas aberrantes de HLA-B27 podem ser  
15 reconhecidas *in vitro* pelos receptores do tipo imunoglobulina das células *killers*  
16 (*killer cell immunoglobulin-like receptor* - KIR). Esses receptores são expressos  
17 principalmente nas células *natural killers* (NK), mas também são encontrados nas  
18 células T CD4<sup>+</sup> circulantes. Pacientes com EA HLA-B27 positivos têm uma  
19 frequência mais alta de células T expressando esse receptor do que indivíduos  
20 saudáveis, e essas células são polarizadas em direção a um fenótipo T helper (Th)  
21 17, com altos níveis de IL-17A sendo produzidos. Finalmente, o HLA-B27 pode ter  
22 um efeito indireto na causa da doença, alterando o microbioma do indivíduo,  
23 resultando na superexpressão da via IL-17A/ IL-23 com ativação de células Th17 ou  
24 células TCD4<sup>+</sup> e outras células imunes inatas. Isto leva à produção de IL-17A, IL-22,  
25 TNF- $\alpha$ , interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e outras citocinas que têm como alvo órgãos e  
26 tecidos diretamente ou pelas de células efectoras residentes em tecidos. O  
27 desequilíbrio na produção destas citocinas pró-inflamatórias resulta nas  
28 manifestações clínicas da EA, tais como as entesites, erosão óssea, sinovites e  
29 colite (SIMONE, MOSSAWI, BOWNESS, 2018).

30 O TNF, citocina pleiotrópica produzida por macrófagos, neutrófilos e linfócitos,  
31 é um forte indutor de uma série de mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12,  
32 IL-18 e IFN- $\gamma$  (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016; HOLBROOK et al., 2019). Composto  
33 por 233 aminoácidos, o TNF é sintetizado como uma proteína transmembrana, fator  
34 de necrose tumoral transmembrana (tmTNF), e em uma forma trimérica que pode

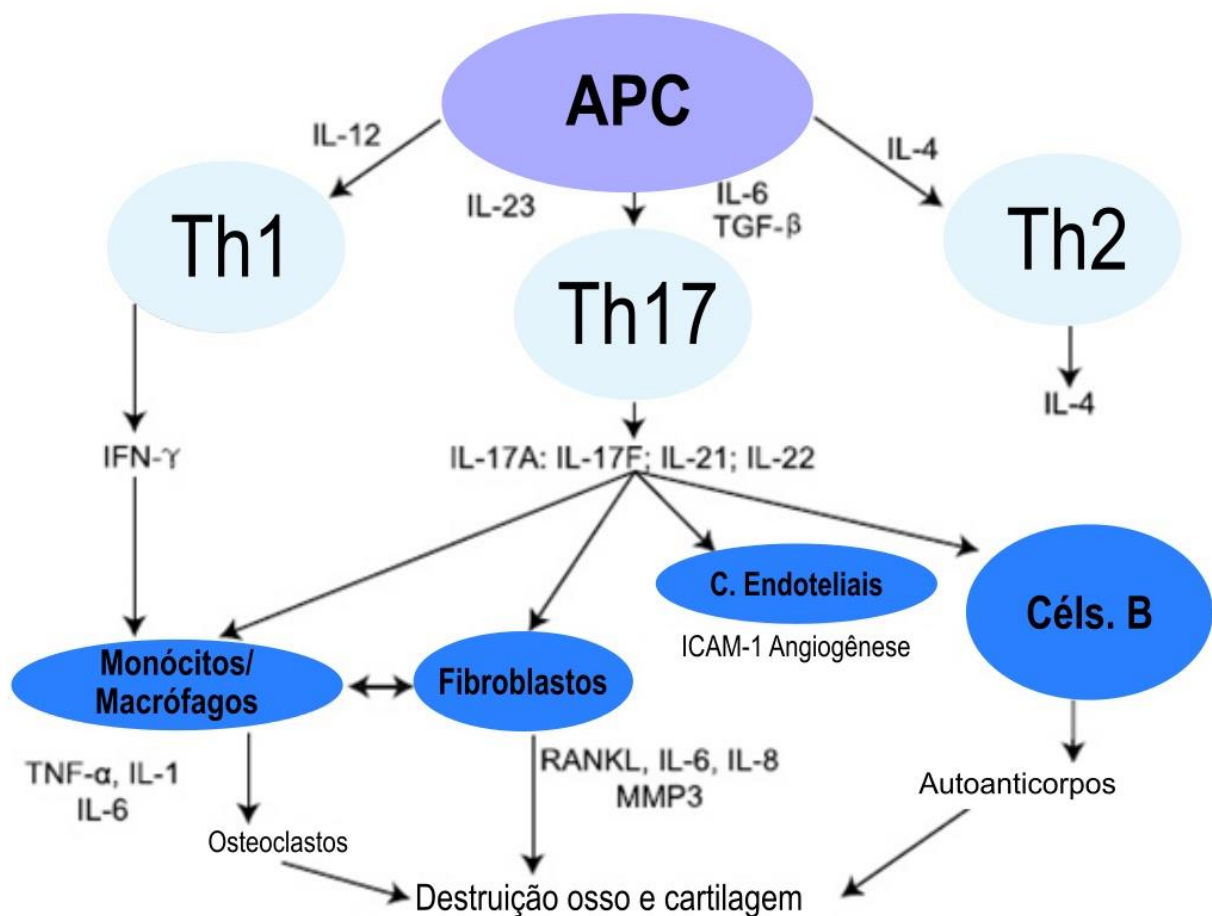
1 ser clivada por uma enzima de conversão em uma forma solúvel, fator de necrose  
2 tumoral solúvel (sTNF). Ambos atuam ligando-se a dois receptores, receptor 1 do  
3 fator de necrose tumoral (TNFR1) e o receptor 2 do fator de necrose tumoral  
4 (TNFR2), presentes em quase todos os tipos celulares nucleados. A ligação do TNF  
5 ao TNFR1 ativa várias vias celulares de homeostase celular e proliferação via fator  
6 de transcrição NF- $\kappa$ B enquanto sua ligação ao TNFR2 ativa à imunidade protetora  
7 contra infecções e morte celular via caspases (HREGGVIDSDOTTIR;  
8 NOORDENBOS; BAETEN, 2014). Além disso, o tmTNF pode atuar como um ligante,  
9 ligando célula a célula aos receptores de TNF, assim como um receptor que  
10 transmite sinais reversos para induzir inflamação local nas células portadoras de  
11 tmTNF (MITOMA et al., 2018). Estudos têm demonstrado aumento do TNF- $\alpha$  em  
12 pacientes com EpAs (BALL et al., 2007; RABELO et al., 2018).

13 Outra citocina envolvida na fisiopatologia da EA é a IL-6. A IL-6 é uma citocina  
14 pleiotrófica envolvida em vias pró e anti-inflamatórias, controle metabólico,  
15 metabolismo ósseo, regeneração, processos neurais e modulação no crescimento  
16 de doenças malignas. Ela é produzida por vários tipos celulares como monócitos,  
17 fibroblastos e células endoteliais constituindo a principal fonte de IL-6 para células T,  
18 células B, osteoblastos e adipócitos atuando como estimulação positivas à essas  
19 células. A IL-6 induz o desenvolvimento de células Th17 a partir de células T naive  
20 (Th0). Por outro lado, a IL-6 inibe a diferenciação em células T regulatórias (Treg)  
21 induzida pelo fator transformador do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), assim favorecendo o  
22 processo inflamatório (LIU et al., 2015b, RABELO et al., 2018).

23 Em relação a IL-17, esta possui papel fundamental na inflamação sinovial e  
24 destruição articular em várias artropatias pelas suas ações nas células sinoviais,  
25 osteoblastos e condrócitos. A diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> para Th17 é  
26 impulsionada por uma combinação de citocinas, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23. No  
27 entanto, a IL17A é produzida pelas células T CD8<sup>+</sup>, células T  $\gamma\delta$ , NK, mastócitos,  
28 neutrófilos e células linfoides inatas. A ligação da IL-17 a seu receptor forma um  
29 complexo que é um potente sinalizador de resposta inflamatória autoimune  
30 associada à artrite, dano tissular e dano articular, assim como mecanismos de  
31 defesa contra microrganismos extracelulares mucocutâneos. Além disso, células  
32 Th17 (IL-17A/IL-22) e seu sistema receptor desempenham importantes funções  
33 mediando os osteoclastos no dano articular associado as artrites inflamatórias

(SIMONE; MOSSAWI, BOWNESS, 2018). A IL-17A, assim como o TNF, é um orquestrador da inflamação, induz a expressão e, sinergicamente com um conjunto de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF e as prostaglandinas, atua em um circuito de retroalimentação positiva para aumentar a produção e os efeitos da própria IL-23 (RANGANATHAN et al., 2017).

**Figura 2** – Envolvimento das citocinas na patogênese das espondiloartrites.



A citocina chave regulatória da IL-17 é a IL-23 derivada das APC. A IL-17 influencia todos os eventos críticos da inflamação, que incluem indução de moléculas de adesão (ICAM-1), estímulo da produção quimiocinas (IL-6 e IL-8) e angiogênese. “*In vitro*” a IL-17 tem demonstrado induzir a osteoclastogênese. APC – Células apresentadoras de antígenos; IL-12 – Interleucina 12; IL-23 – Interleucina 23; IL-6 – Interleucina 6; TGF-β – fator de transformação de crescimento beta; IL-4 – Interleucina 4; Th1 – Linfócitos T *helper* 1; Th17 – Linfócitos T *helper* 17; Linfócitos T *helper* 2; IFN-γ - Interferon gama; IL-17A – Interferon 17A; Interferon 17F – Interferon 17F; IL-21 – Interleucina-21; IL-22 – Interleucina 22; C. Endoteliais – Células endoteliais; ICAM-1 – Moléculas de adesão intercelular-1; Células B – Células B; RANKL - ligante do receptor ativador do fator nuclear *kappa* B; MMP3 – Metaloproteinase de matriz 3. **Fonte:** Adaptado de RAYCHAUDHURI (2012).

Vários estudos tem demonstrado alteração nos níveis de citocinas em pacientes com EpA (BAL et al., 2007; PRZEPIERA-BĘDZAK; FISCHER; BRZOSKO,

1 2015; SVEAAS et al., 2015; DUAN et al., 2017). No entanto, os dados são  
2 conflitantes quanto a sua associação com a atividade da doença (BAL et al, 2007;  
3 HAYER et al., 2010; PRZEPIERA-BĘDZAK; FISCHER; BRZOSKO, 2015).

4

#### 5 1.1.4 Tratamento da EA

6

7 Os AINEs constituem a terapia de primeira linha no tratamento das EpAax  
8 pela recomendação ASAS (VAN DER HEIJDE et al., 2017) assim como no Protocolo  
9 de Diretrizes Clínica e Terapêuticas (PCDT). Se houver falha – definida como  
10 ausência de redução de, pelo menos, 50% ou de dois pontos absolutos no BASDAI  
11 ou ausência de redução de pelo menos 1,1 ponto na escala ASDAS - com AINE em  
12 dose adequada por um mês, deve-se substituí-lo por outro AINE; se houver falha  
13 com dois AINEs diferentes em doses adequadas por três meses no total (um a dois  
14 meses com o primeiro AINE e um a dois meses com o segundo AINE), deve-se  
15 considerar o uso de inibidores de TNF- $\alpha$  na lombalgia inflamatória ou na entesite  
16 confirmada por exame de imagem (VAN DER HEIJDE et al., 2017, MINISTÉRIO DA  
17 SAÚDE, 2017)

18 O uso de medicações biológicas melhorou consideravelmente o tratamento  
19 dos pacientes com EA desde a inclusão dos inibidores de TNF nas recomendações  
20 ASAS de 2003 e mais recentemente com os inibidores da IL-17, as opções  
21 terapêuticas se ampliaram (VAN DER HEIJDE et al., 2017).

22 Diminuição nos níveis de IL-6 e PCR têm sido sugeridos como preditores da  
23 resposta aos inibidores de TNF- $\alpha$  no tratamento da EA. Visvanathan e colaboradores  
24 (2008) randomizaram pacientes com EA em uma proporção de 3:8, um grupo  
25 recebeu infliximabe (inibidor de TNF) 5mg/ kg e o outro placebo. Foram analisados  
26 biomarcadores como IL-6, PCR e VEGF e relacionados ao BASDAI e a atividade na  
27 RNM de sacroilíacas, nas semanas 0, 2 e 24. Os autores demonstraram significativa  
28 redução nos níveis plasmáticos de IL-6, VEGF e PCR no grupo em uso de  
29 infliximabe comparado ao placebo nas semanas 2 e 24. No mesmo estudo foi  
30 demonstrada associação entre a redução da IL-6 no grupo em uso de infliximabe até

1 a semana 2 e a redução no BASDAI entre as semanas 0 e 24 e atividade na RNM  
2 no mesmo período.

3 Os autores concluíram que há redução significativa dos biomarcadores no  
4 grupo tratado com infliximabe comparado ao placebo e que os níveis de IL-6 e PCR  
5 estão implicados na resposta com o tratamento com infliximabe. Além de que  
6 reduções significativas precoces (em 2 semanas) de IL-6 esteve relacionada à  
7 menor atividade de doença e menor inflamação na RNM de sacroilíacas.

8 Apesar dos pacientes com EA apresentarem maiores níveis de IL-6, estudo  
9 fase 2/3 com o anticorpo monoclonal antirreceptor de IL-6, tocilizumabe, não  
10 demonstrou benefício clínico (SIEPER et al., 2014). Um estudo de fase 2 com o  
11 sarilumabe, anticorpo monoclonal inibidor da IL-6, também não demonstrou qualquer  
12 benefício (SIEPER et al., 2015). Esses resultados sugerem que apesar da IL-6 estar  
13 relacionada com a patogênese das EpAs, não é um bom alvo terapêutico. No  
14 entanto, as limitações destes estudos são que somente foram avaliados pacientes  
15 com a doença axial e não foram avaliados pacientes com doença inicial  
16 (HREGGVIDSDOTTIR; NOORDENBOS; BAETEN, 2014).

17 Atualmente no Brasil, os inibidores de TNF- $\alpha$  disponíveis são: etanercepte,  
18 adalimumabe, infliximabe, golimumabe e certolizumabe. Após três meses de uso  
19 destes medicamentos de acordo com o ASAS e seis meses pelo PCDT, é  
20 considerada falha o paciente que não apresentar uma redução de pelo menos 1,1  
21 pontos no ASDAS ou 2 pontos no BASDAI. Esses pacientes que falharem ao  
22 primeiro inibidor de TNF deve-se trocar o biológico para outro ou para um inibidor da  
23 IL-17 (secuquinumabe), respeitando o mesmo critério anteriormente citado, assim  
24 como a divergência de tempo pelas recomendações (ANEXO E e F). A identificação  
25 dos pacientes que irão apresentar falha no tratamento é de suma importância uma  
26 vez que o uso destes medicamentos pode resultar em uma série de complicações  
27 infecciosas e neoplásicas malignas, além de apresentarem um custo bastante  
28 elevado (HARVARD et al., 2017).

29

### 1 1.1.5 Estudos que Avaliaram Citocinas em EpA

2

3 Gratacós e colaboradores (1994) avaliaram 69 pacientes com EA e 36  
4 controles com dor lombar não inflamatória e demonstraram correlação dos níveis  
5 séricos de IL-6 com parâmetros clínicos da doença como: rigidez matinal avaliada  
6 pela EVA e mobilidade vertebral avaliado pelo teste de Schober. No mesmo estudo,  
7 parâmetros laboratoriais, tais como PCR e VHS também foram associados à níveis  
8 séricos de IL-6. No entanto, os níveis de TNF- $\alpha$  não foram associados.

9 Braun e colaboradores (1995) e François e colaboradores (2006) relataram  
10 superexpressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 em biópsias de articulações sacroilíacas de  
11 pacientes com EA e concluíram que tais citocinas estão envolvidas em lesões ativas  
12 e precoces.

13 Falkenbach; Herold e Wigand (2000) avaliaram se os níveis plasmáticos de  
14 IL-6 poderiam ser utilizados como preditores de alterações na mobilidade após 1 ano  
15 de seguimento de 128 pacientes com EA. Os autores concluíram que os níveis  
16 plasmáticos de IL-6 não permitiram prever a progressão da doença. Já Bal e  
17 colaboradores (2007) avaliaram 70 pacientes com diagnóstico de EA conforme  
18 critérios de Nova York e 29 indivíduos sem EA. Os autores demonstraram que  
19 pacientes com EA apresentaram níveis plasmáticos elevados de IL-6 e TNF- $\alpha$ , mas  
20 essas citocinas não foram associadas ao BASMI e BASFI. Os autores concluíram  
21 que estas citocinas estão implicadas na patogênese da EA. Assim como, Hayer e  
22 colaboradores (2010) ao avaliarem 25 pacientes com EA e compara-los a 20  
23 indivíduos controles sem EA ajustados por sexo, idade e IMC demonstraram além de  
24 maiores níveis plasmáticos de IL-6 no grupo EA, a associação desta IL com maiores  
25 índices de BASDAI, além de maiores níveis plasmáticos de PCR e VHS.

26 Sezer e colaboradores (2012) avaliaram 48 pacientes com EA e 48 controles  
27 sem espondilite anquilosantes pareados por idade e sexo, quanto à doença  
28 periodontal. A frequência da doença foi semelhante entre os dois grupos, além disso,  
29 não houve diferença significativa na profundidade de sondagem, nível clínico de  
30 inserção e índice de placa o único parâmetro clínico significativo entre os grupos foi  
31 o sangramento pós sondagem no grupo EA. Já os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR  
32 foram maiores no grupo com espondilite anquilosante.

1           Taylan e colaboradores (2012) avaliaram 127 pacientes com EA e 38  
2 indivíduos controles sem EA, os pacientes com EA apresentaram maiores níveis de  
3 IL-6, IL-12, TGF- $\beta$ , IL-17 e IL-23 em relação aos controles. Ainda neste mesmo ano,  
4 Limón-Camacho e colaboradores (2012) avaliaram as subpopulações de células T  
5 (Th1, Th2, Th17 e Treg) e os níveis de citocinas em pacientes com EA, em  
6 tratamento ou não com inibidores de TNF- $\alpha$  e indivíduos controles sem EA.  
7 Pacientes com EA apresentam maior população de células Th1 e Th17 do que  
8 pacientes em tratamento com inibidores de TNF- $\alpha$  e também de controles. No  
9 entanto, pacientes com EA também apresentaram aumento na população de células  
10 Treg. Isso provavelmente ocorra devido a mecanismos compensatórios ou ainda  
11 pode estar relacionado a via de diferenciação comum entre as células Th17 e Treg,  
12 sugerindo que estas células Treg poderiam tornar-se células Th17 (BAECHER-  
13 ALLAN; VIGLIETTA; HAFLER, 2002).

14           Przepiera-Bedzak; Fischer; Brzosko (2015) avaliaram 152 pacientes com EpA  
15 (62 pacientes com EA, 69 pacientes com APso e 22 com síndrome SAPHO,  
16 derivada do acrônimo: sinovite, acne, pustulose, hiperostose e osteíte), e  
17 compararam com 29 indivíduos controles sem EA, APso e SAPHO. Apesar de os  
18 níveis de IL-6 e IL-23 terem sido maiores no grupo com EA, não foi encontrada  
19 relação destas ILs com a atividade da doença pelo BASDAI e a EVA, assim como  
20 com os valores de PCR e VHS.

21           Ainda em 2015, Sveaas e colaboradores avaliaram, em 143 pacientes com  
22 EA e 124 indivíduos controles sem EA, os níveis plasmáticos de PCR, de citocinas e  
23 seus receptores e de VHS. Pacientes com EA apresentaram níveis elevados de PCR  
24 e maior VHS quando comparados aos controles. Os níveis plasmáticos de receptor 1  
25 de fator de necrose tumoral solúvel (sTNF-R1), receptor 2 de fator de necrose  
26 tumoral solúvel (sTNF-R2) e osteoprotegerina (OPG) também mostraram-se  
27 elevados, mesmo após ajustados pela idade, sexo, IMC e tabagismo. Não houve  
28 diferença estatística nos níveis de IL-6, IL-17A e IL-23. Foi demonstrada associação  
29 entre os níveis de OPG e índices de atividade de doença (ASDAS e BASDAI), assim  
30 como com a PCR e VHS. Os autores concluíram que os níveis plasmáticos de sTNF-  
31 R1, sTNF-R2 e OPG estão elevados em pacientes com EA. No entanto, os níveis de  
32 marcadores inflamatórios não se relacionaram aos índices de atividade de doença.

1            Ainda no mesmo ano, Liu e colaboradores (2015) compararam 22 amostras  
2 de biópsia de tecido sinovial de articulações sacroilíacas de paciente com EA  
3 admitidos no Hospital Yantaishan na China, entre janeiro de 2010 e maio de 2014 e  
4 22 amostras de tecido de cabeça de fêmur de pacientes que sofreram fratura e que  
5 se submeteram à cirurgia aberta. Os autores evidenciaram a expressão de TNF- $\alpha$ ,  
6 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metaloproteinase de matrix 3  
7 (MMP-3) exclusivamente no grupo com EA. Houve também correlação positiva entre  
8 os níveis de expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) relacionados ao  
9 TNF- $\alpha$ , VEGF, MMP-3, BASDAI e níveis séricos plasmáticos de PCR, entre o grupo  
10 EA e controle.

11            Duan e colaboradores (2017) comparam os níveis de citocinas em 21  
12 pacientes com EA e 22 pacientes com HLA-B27 presente, mas sem EA e 16  
13 indivíduos controles sem EA e com HLA-B27 ausente. Os grupos não diferiram  
14 quanto à produção de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, e TNF- $\alpha$  pelas células T CD8<sup>+</sup>; já a  
15 produção de IL-6 foi significativamente maior no grupo com EA.

16            Outro estudo publicado também em 2017, agora por Asadbeik e  
17 colaboradores, avaliaram 48 pacientes iranianos com EA e os comparou com 47  
18 indivíduos controles sem EA. Foi determinada a expressão dos mRNA relacionados  
19 ao TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Somente a expressão de mRNA relacionado ao TNF- $\alpha$   
20 mostrou-se elevada quando comparado o grupo EA e controle. Já quando  
21 correlacionado aos parâmetros clínicos, houve correlação positiva entre a expressão  
22 de TNF- $\alpha$  e o BASDAI e correlação negativa entre o IFN- $\gamma$  e BASFI. Concluíram,  
23 portanto, que o TNF- $\alpha$  é a citocina inflamatória mais importante relacionada ao  
24 desfecho em pacientes iranianos com EA.

25            Estudo realizado no sul do Brasil, Rabelo e colaboradores (2018) comparam  
26 32 pacientes com EA e o mesmo número de pacientes controles sem EA pareados  
27 por idade e sexo. Foram avaliados os níveis de citocinas e a relação com  
28 parâmetros de atividade e qualidade vida. As citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-8  
29 foram significativamente elevadas no grupo EA, os autores atribuem possivelmente o  
30 aumento da IL-10 (citocina anti-inflamatória) há uma via de retroalimentação  
31 negativa. As concentrações de IL-1, IL-12, IL-23 e IL-17 não diferiram entre os  
32 grupos. Houve correlação entre as concentrações plasmáticas de IL-6, BASMI e

1 índice de mobilidade da coluna. Sendo assim, os autores concluíram que a IL-6 está  
2 envolvida na patogênese da doença axial.

3 No entanto, neste mesmo ano, Van Mens e colaboradores, em estudo de  
4 coorte de 12 semanas com 20 pacientes com EpA em atividade e em uso de inibidor  
5 de IL-17 (secuquinumabe), evidenciaram a diminuição importante da expressão  
6 sinovial de IL-17A demonstrando o envolvimento desta citocina na fisiopatologia da  
7 doença.

8 Recentemente, Nossent, Sagen-Johnsen e Bakland (2019) avaliaram em 164  
9 pacientes com EA, a relação entre os níveis de ILs (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 e IL-17) e o  
10 índice de atividade de doenças avaliado pelo *Ankylosing Spondylitis Disease Activity*  
11 *Score – PCR* (ASDAS-PCR), o BASFI e os níveis plasmáticos de PCR. Não foi  
12 demonstrado relação com essas variáveis e os autores sugerem que a mensuração  
13 na prática clínica das IL para o manejo da EA não seja adequada.

14 Desta forma, de acordo com os artigos acima descritos, pode-se concluir que  
15 as citocinas possuem um papel importantíssimo na fisiopatologia das EpA. Embora  
16 alguns dados sejam conflitantes em relação ao aumento dos seus níveis e sua  
17 associação com a atividade da doença, é inegável o envolvimento do TNF- $\alpha$ , IL-6 e  
18 IL-17 em sua fisiopatologia. O que desperta o interesse, portanto, na associação dos  
19 seus níveis plasmáticos com atividade de doença, resposta terapêutica e variantes  
20 genéticas.

21

#### 22 1.1.6 Variantes Genéticas do *IL6*

23

24 Com a evolução da tecnologia e a possibilidade de genotipagem de variantes  
25 de um único nucleotídeo (SNV – *single nucleotide variant*), o início dos anos 2000  
26 inaugurou uma nova era nos estudos de associação gênica para diversas doenças  
27 (BROWN; KENNA; WORDSWORTH, 2016). A descoberta de novas associações  
28 genéticas além do HLA-B27 apontou para vias já conhecidas e outras inesperadas  
29 de citocinas inflamatórias que podem estar envolvidas na patogênese da EA.

30 SNVs em genes de citocinas pró-inflamatórias, como o *IL6* poderiam modificar  
31 os níveis plasmáticos e atividade da IL-6, e assim influenciar no processo de doença

1 e desfechos clínicos. A transcrição é um etapa regulatória para expressão da IL-6, e  
2 a região promotora do gene *IL6* possui vários polimorfismos que podem influenciar  
3 em sua transcrição (AKHTER et al., 2019).

4 Têm sido demonstrados que níveis elevados de IL-6 estão envolvidos na  
5 fisiopatologia de EpA (RABELLO et al., 2018). Os níveis plasmáticos e teciduais de  
6 IL-6 são dependentes de vários fatores ambientais como também genéticos. Desta  
7 forma, várias pesquisas têm sido realizadas com intuito de identificar variantes  
8 genéticas que possam alterar os níveis de IL-6 e assim favorecer a suscetibilidade e  
9 progressão de doenças. Mais de 50 SNV na região promotora do *IL6* tem sido  
10 descritos, tais como -174 G>C (rs1800795) e o -572 G>C (rs1800796) (FISHMAN et  
11 al., 1998; TERRY; LOUKACI; GREEN, 2000). Indubitavelmente, o maior número de  
12 publicações destina-se a pesquisa da variante -174 G>C. A troca de uma guanina  
13 por uma citosina (G>C) na posição -174 pode interferir na transcrição do gene e  
14 conseqüentemente alterar os níveis séricos de IL-6 (FISHMAN et al., 1998).  
15 Enquanto o genótipo CC está associado níveis plasmáticos menores de IL-6, os  
16 genótipos GG e CG estão ligados a níveis plasmáticos elevados de IL-6 (FISHMAN  
17 et al., 1998; IMANI et al., 2017). Já o genótipo GG da variante -572 G>C do *IL6* foi  
18 associado com menores níveis circulantes de IL-6 e risco diminuído de doença renal  
19 crônica na população japonesa (OKADA et al., 2012).

20 Os dados sobre o efeito desta variante -174 G>C nos níveis de IL-6 na  
21 população (PEREIRA et al., 2011; HUANG et al., 2013) e em diversas doenças  
22 ainda é controverso (LORENTE et al., 2016; AKHTER et al. 2019; LIMA et al., 2019).

23 Uma meta-análise publicada em 2013 avaliou a associação entre a variante  
24 genética -174G>C do *IL6* e os níveis circulantes de IL-6 na população (sem doença  
25 relatada) em 19 estudos. Os autores concluíram que não houve associação entre os  
26 níveis de IL-6 e essa variante genética (HUANG et al., 2013). Já um estudo brasileiro  
27 avaliou a variante -174 do *IL6* em mulheres idosas que moravam em casas de  
28 repouso e na comunidade em geral da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais e sua  
29 associação com os níveis de IL-6. Os autores demonstraram aumento dos níveis  
30 plasmáticos de IL-6 em mulheres que apresentavam o genótipo GG e moram em  
31 casas de repouso. Os autores concluíram que a variante genética do *IL6* -174 G>C  
32 está associada com a variabilidade individual dos níveis plasmáticos de IL-6 em  
33 mulheres idosas e que os níveis mais elevados de IL-6 nos indivíduos

1 institucionalizados possa ser consequência de grupo distinto com mais  
2 comorbidades, doenças associadas e depressão (PEREIRA et al., 2011).

3 Um estudo espanhol observacional prospectivo e multicêntrico com 263  
4 pacientes com sepse avaliou o envolvimento da variante genética -174 G>C com os  
5 níveis de IL-6 e mortalidade dos pacientes em 30 dias. Foi demonstrado que  
6 pacientes com o genótipo CC apresentavam menor escore *Sepsis-related organ*  
7 *failure assessment* (SOFA), menores níveis de IL-6 e menor mortalidade após 30  
8 dias quando comparado aos demais genótipos (GG e GC). Os autores concluíram  
9 que pacientes com o genótipo CC apresentam desfecho mais favorável no caso de  
10 diagnóstico de sepse (LORENTE et al., 2016).

11 Uma publicação recente avaliou a influência de variantes do *IL6* (-174G>C, -  
12 572G>C e -597G>A) e o nível plasmático de IL-6 em jovens indianos com acidente  
13 vascular cerebral (AVC). Os autores demonstraram que não houve associação entre  
14 as variantes e o desenvolvimento de AVC isquêmico (AKHTER et al. 2019).

15 Recentemente, foi publicada uma meta-análise para avaliar a associação da  
16 SNV -174 G>C no risco e mortalidade para sepse. Foram analisados 20 estudos  
17 (totalizando 3282 casos e 4926 controles para avaliar a associação com o risco para  
18 sepse e 8 estudos (totalizando 610 casos e 1856 controles) para avaliar a sua  
19 associação com a mortalidade. Os autores concluíram que essa variante não está  
20 associada ao risco e mortalidade em pacientes com sepse (CHEN et al., 2019).

21 Em relação aos estudos publicados referentes às variantes genéticas -174  
22 G>C e -572 G>C em doenças autoimunes, os dados também são controversos. Em  
23 2001, Hulkkonen e colaboradores avaliaram 66 pacientes com Síndrome de Sjögren  
24 Primária e 400 controles saudáveis para verificar se a variante genética -174 G>C  
25 predispõem e está associada às manifestações clínicas da doença. A frequência  
26 alélica não diferiu entre os grupos. Os autores concluíram que esta variante não está  
27 associada a predisposição genética a Síndrome de Sjögren e que os níveis de IL-6  
28 estão alterados de acordo com as manifestações clínicas.

29 Lee e colaboradores (2012) realizaram uma meta-análise para determinar se  
30 as variantes -174 G>C e -572 G>C do *IL6* estão associadas à suscetibilidade ao  
31 lúpus eritematoso sistêmico (LES). A avaliação do -174 G>C demonstrou associação  
32 entre o alelo G e LES em todos os estudos, e foi demonstrado também a sua

1 associação com a presença de LES em europeus. Em relação a variante -572 G>C,  
2 foi demonstrada à associação com a suscetibilidade ao LES na população iraniana,  
3 dados de um único estudo, mas não na população asiática. Desta forma, os autores  
4 concluíram que a variante -174 G>C está associada a suscetibilidade ao LES na  
5 população europeia e que o -572 G>C não está associado na população asiática.  
6 Mais estudos seriam necessários para verificar a associação destas variantes em  
7 diferentes populações étnicas. Ainda em relação ao LES, em 2015 uma nova meta-  
8 análise foi publicada avaliando os dados referentes as variante -174 G>C e -572  
9 G>C. Foram incluídos 15 estudos e a meta-análise etnia específica foi conduzida em  
10 3 populações: europeia, iraniana e asiática. Foi demonstrada associação entre a  
11 variante -174 G>C na população total, no modelo alélico, no modelo dominante e no  
12 modelo recessivo. Dados semelhantes, mas incluindo também o modelo de  
13 contraste de homozigotos, foram obtidos na avaliação da população europeia, mas  
14 não nas demais. Essa variante também foi associada a presença de anticorpos  
15 antinucleares, no modelo recessivo, e a lesões discoides no modelo alélico. Em  
16 relação a variante -572 G>C, esta variante foi associada ao LES quando avaliado  
17 com a população total no modelo recessivo, mas não nos demais modelos e também  
18 não associada a população asiática. Os autores concluíram que estas variantes  
19 podem ter um papel importante na suscetibilidade ao LES (CUI et al., 2015).

20 Boca e colaboradores (2013) avaliaram a associação de algumas variantes  
21 alélicas de citocinas, entre ela a -174 G>C do *IL6* e a proteção ao desenvolvimento  
22 de psoríase. Os autores demonstraram menor frequência do genótipo CC assim  
23 como do GC em pacientes com psoríase quando comparados à indivíduos  
24 saudáveis, sugerindo que esta variante genética é um biomarcador de proteção para  
25 desenvolvimento de psoríase.

26 Lee e colaboradores (2014) avaliaram a variante *IL6* (-174 G>C) em 752  
27 chineses com AR não tratados e 798 indivíduos saudáveis. Os autores  
28 demonstraram que o alelo C e o genótipo CC foram associados ao maior risco para  
29 AR, após ajuste para fatores confundidores como sexo, idade, IMC, tabagismo e  
30 trabalho pesado.

31 Ainda em relação a AR, um estudo posterior de Lima e colaboradores (2019)  
32 avaliaram a associação de variantes genéticas de citocinas, seus níveis plasmáticos  
33 e escores clínicos em 126 pacientes com AR e 177 indivíduos saudáveis. Pacientes

1 com AR apresentaram maiores níveis de IL-6 do que indivíduos controles. Além  
2 disso, os autores demonstram uma correlação positiva entre os níveis de IL-6 e o  
3 CDAI, DAS 28, presença de erosões ósseas, níveis de PCR e de IFN- $\gamma$ . No entanto,  
4 não foi encontrada associação entre a variante genética -174 G>C (rs1800795) e os  
5 níveis de IL-6 em indivíduos heterozigotos (GC). Os autores destacam a possível  
6 participação de outros fatores na variação dos níveis de IL-6, como a acetilação de  
7 histonas e metilação do DNA.

8 Imani e colaboradores (2017) publicaram uma revisão sistemática e meta-  
9 análise em que avaliaram a associação da variante -174 G>C com a suscetibilidade  
10 à doença de Graves. Um total de 4 estudos do tipo caso-controle com 554 pacientes  
11 com doença de Graves e 1201 indivíduos saudáveis foram incluídos na meta-  
12 análise. Uma significativa associação com a suscetibilidade foi demonstrada no  
13 modelo dominante, no modelo recessivo e no modelo de contraste de homozigoto.  
14 Não houve associação quando o modelo alélico foi testado. Os autores concluíram  
15 que a variante -174 G>C está associada ao risco para desenvolver doença de  
16 Graves.

17 Embora as variantes -174 G>C e -572 G>C do *IL6* tenham sido investigadas  
18 em outras doenças como anteriormente exemplificado, poucos estudos avaliaram a  
19 variante -174 G>C na suscetibilidade à EA.

20 Collado-Escobar e colaboradores (2000) avaliaram a variante -174G>C do  
21 *IL6* em 98 pacientes com EA e 157 controles doadores de sangue da mesma região  
22 dos casos. Não foi demonstrada associação entre essa variante e a suscetibilidade à  
23 EA. Foi comparado também 79 casos, dos 98 selecionados com EA, que  
24 apresentavam HLA-B27 presente com um grupo adicional de 52 controles com HLA-  
25 27 positivo e também não houve diferença. Os autores concluíram que a variante -  
26 174G>C do *IL6* não tem papel importante na suscetibilidade para EA e que são  
27 necessários estudos mais robustos.

28 Posteriormente, Cubino e colaboradores (2016) avaliaram a associação da  
29 variante -174 G>C e o padrão periférico de acometimento articular na APso  
30 comparado aos padrão misto de acometimento que englobava o acometimento axial  
31 e misto (axial e periférico). Os autores concluíram que a frequência do alelo G foi

1 maior nos pacientes com padrão de acometimento periférico, denotando uma  
2 associação com a forma de acometimento periférico na APso.

3 A resposta ao tratamento com imunobiológicos é individual e fatores genéticos  
4 podem estar envolvidos neste processo. Uma meta-análise publicada por Lee e  
5 colaboradores (2014) confirmou que pacientes com AR que apresentavam o alelo C  
6 da variante -174 G>C do *IL6* apresentavam pior resposta terapêutica ao uso de  
7 inibidores do TNF- $\alpha$ . No entanto, os dados sobre o envolvimento desta variante em  
8 pacientes com EpA são muito escassos. Apenas Fabris e colaboradores avaliaram,  
9 em 2016, o envolvimento da variante -174 G>C na resposta terapêutica em  
10 pacientes com EpA. Os autores demonstraram que pacientes homozigotos GG  
11 apresentavam maior chance de responder ao uso do primeiro inibidor de TNF- $\alpha$   
12 após 12 meses de tratamento do que aqueles com o genótipo GC+CC.

13 Como acima descrito, os dados quanto à associação destas variantes  
14 genéticas em diferentes doenças são bastante controversos. Mesmo quando  
15 avaliadas as publicações em uma única doença ainda não há consenso. Somente  
16 um estudo publicado por Collado-Escobar e colaboradores (2000) avaliou a variante  
17 -174G>C em indivíduos com EA. Não há até o presente momento estudos que  
18 tenham avaliado a variante -572 G>C (rs1800796) e também as variantes em  
19 haplótipos em pacientes com EpA.

20

## 2 JUSTIFICATIVA

Embora vários estudos tenham avaliado o envolvimento da variante genética -174 G>C do *IL6* em várias doenças e sua relação com os níveis circulantes de IL-6, os dados ainda são bastante conflitantes e sofrem influência do sexo e etnia dos indivíduos (LEE et al., 2012). Além disso, os dados são bastante escassos em relação à EA (COLLADO-ESCOBAR et al., 2000). Em relação a variante -572 G>C do *IL6* não há relatos de estudos em pacientes com EA.

Não há ainda estudos que tenham associado estas variantes do *IL6* com seus níveis plasmáticos e os índices de atividade da doença e mobilidade da coluna em pacientes com EA.

Além disso, a identificação de marcadores genéticos preditores de resposta à droga pode auxiliar na otimização do tratamento e prevenção de reações adversas, diminuição de custos, bem como na indicação de tratamento com outras classes de imunobiológicos (HARVARD et al., 2017; LINDSTRÖM et al., 2019). Há apenas um estudo que avaliou o envolvimento da variante -174G>C do *IL6* na resposta terapêutica ao uso de inibidores de TNF- $\alpha$  em pacientes com EpA (FABRIS et al., 2016). Em relação a variante -572 G>C do *IL6* não há qualquer estudo até o presente momento.

Desta forma, a melhor compreensão da fisiopatologia da doença assim como um melhor entendimento sobre fatores genéticos relacionados ao sucesso de tratamento, podem direcionar a prática clínica à uma medicina personalizada com um tratamento que leve em consideração o perfil genético do indivíduo, evitando o uso de medicamentos que sejam incompatíveis com a característica genética, minimizar efeitos adversos e consequentemente diminuir custos.

### 1 3 OBJETIVO

2

#### 3 3.1 OBJETIVO GERAL

4 Avaliar a associação das variantes -174 G>C e -572 G>C do *IL6* na  
5 suscetibilidade à EA assim como com os níveis plasmáticos de citocinas, os índices  
6 funcionais e de atividade da doença, e a resposta terapêutica ao uso de inibidores  
7 do TNF- $\alpha$ .

8

#### 9 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 10 - Comparar a frequência das variantes genéticas do *IL6* -174 G>C (rs1800795) e -  
11 572 G>C (rs1800796) em pacientes com EA e indivíduos controles sem EA;
- 12 - Avaliar a associação entre as variantes genéticas do *IL6* -174 G>C (rs1800795) e -  
13 572 G>C (rs1800796) em haplótipo com a suscetibilidade a EA;
- 14 - Determinar a associação das variantes genéticas citadas, individualmente e em  
15 haplótipo, com os níveis plasmáticos de citocinas;
- 16 - Verificar a associação das variantes do *IL6*, o índice funcional e o índice de  
17 atividade da doença;
- 18 - Associar as variantes genéticas, isoladamente ou em haplótipo, e a resposta  
19 terapêutica ao uso de inibidores do TNF- $\alpha$  em pacientes com EA após 12 meses de  
20 tratamento.

21

## 4 SUJEITOS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE 64799616.4.0000.5231) (ANEXO G). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (APÊNDICE A). Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas na Declaração de Helsinque.

### 4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Inicialmente, foi realizado um estudo caso-controle, foram selecionados 124 indivíduos sem EA (grupo controle) e 88 pacientes com EA, de ambos os sexos e com idade entre 18 a 70 anos, atendidos no Hemocentro Regional de Londrina (grupo controle) e pelo ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidade do Hospital Universitário de Londrina, respectivamente. A etnia foi autorreportada. O diagnóstico de EA foi realizado de acordo com os critérios de New York modificados (LINDEN; VALKENBURG; CATS, 1984). Os seguintes instrumentos clínicos foram utilizados para avaliar os pacientes com EA: BASDAI (GARRET et al, 1994) e *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index* (BASFI) (SHINJO; GONÇALVES; GONÇALVES, 2006; CUSMANICH; KOWALSKI; GALLINARO, 2012).

Foram considerados critérios de exclusão em ambos os grupos os seguintes fatores: presença de outras doenças autoimunes, doença renal crônica dialítica, cirrose, reposição hormonal, uso suplementos antioxidantes, doenças infecciosas agudas ou crônicas, paciente com diagnóstico de doença oncológica. Nenhum dos participantes reportou uso regular de bebida alcoólica. O IMC foi calculado pela divisão entre o peso corporal e o quadrado da altura e expresso em Kg/m<sup>2</sup>.

1

2           Posteriormente, foi realizado um estudo de coorte retrospectivo de pacientes  
3 com EA (n=52) para avaliar a resposta terapêutica ao uso de inibidores de TNF- $\alpha$   
4 (adalimumabe, etanercepte e infliximabe) após 12 meses de tratamento. Os  
5 pacientes foram subdivididos em dois grupos de acordo com a resposta terapêutica:  
6 respondedores (n=41) e não respondedores (n=11). Foi considerada falha  
7 terapêutica ao uso do primeiro inibidor do TNF quando após 12 meses de tratamento  
8 o paciente apresentou BASDAI $\geq$ 4 (VAN DER HEIJDE, et al. 2016).

9

#### 10 4.3 EXAMES LABORATORIAIS

11

##### 12 **4.3.1 Determinação Do HLA-B27 E Dos Níveis Plasmáticos De Citocinas**

13           As amostras de sangue foram coletadas com o sistema de coleta a vácuo em  
14 tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante e em  
15 tubos sem anticoagulante após 12 horas de jejum. Após a coleta, as amostras foram  
16 identificadas com números sequenciais para garantir a confidencialidade e o material  
17 foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Plasma, soro e *buffy-coat*  
18 foram aliquotados em tubos tipo *ependorf* e armazenados em *freezer* -80°C para  
19 posterior análise. Os níveis plasmáticos das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17A foram  
20 determinados por imunofluorimetria utilizando *Kit ProcartaPlex Human High*  
21 *Sensitivity* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria) para a plataforma  
22 Luminex®. Os resultados foram expressos em pg/mL. A presença de HLA-B27 foi  
23 determinada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de detecção dos  
24 produtos por imunofluorimetria utilizando a plataforma LUMINEX®.

25

26

##### 27 4.3.2 Variantes Genéticas Do *IL6* (rs1800795 e rs1800796)

28

29           A variante -174 G>C (rs1800795) e -572 G>C (rs1800796) do *IL6* foram  
30 avaliadas por PCR qualitativa (qPCR) em tempo real (Real Time). Para a variante -  
31 174 G>C (rs1800795) foi utilizado um ensaio validado (C\_\_1839697\_20, Life  
32 Technologies Corporation, USA) com *primers* específicos e sondas fluorescentes

1 para determinação dos possíveis genótipos (**[VIC/FAM]** ACT TTT CCC CCT AGT  
2 TGT GTC TTG C**[C/G]**A TGC TAA AGG ACG TCA CAT TGC ACA). Para a variante  
3 -572 G>C (rs1800796) foi utilizado um ensaio validado (C\_\_11326893\_10, Life  
4 Technologies Corporation, USA) com *primers* específicos e sondas fluorescentes  
5 para determinação dos possíveis genótipos (**[VIC/FAM]** ATG GCC AGG CAG TTC  
6 TAC AAC AGC C**[C/G]**C TCA CAG GGA GAG CCA GAA CAC AGA). Os níveis de  
7 fluorescência dos produtos de PCR foram avaliados pelo termociclador StepOne  
8 (AppliedBiosystems).

9

#### 10 4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

11

12 As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste exato de Fisher ou qui-  
13 quadrado, conforme apropriado. Os dados foram expressos em número absoluto  
14 (%). As diferenças de frequência entre os grupos foram avaliadas pelo teste do qui-  
15 quadrado. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de normalidade  
16 Shapiro-Wilk. Para avaliar a homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste de  
17 Levene. Os dados que não mostraram distribuição normal ou homogeneidade da  
18 variância foram transformados em logaritmo natural (Ln) e testados novamente  
19 quanto à normalidade. Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste t de  
20 Student. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $\pm$  DP). Os dados  
21 não paramétricos foram avaliados pelo teste de Mann Whitney e os dados foram  
22 expressos em mediana e percentis (25% -75%).

23 A associação entre as variantes genéticas do *IL6* foi analisada em modelos  
24 alélico, dominante, codominante e recessivo. A inferência dos locais de  
25 recombinação entre os alelos do *IL6* foi determinando usando-se o *software* PHASE  
26 versão 2.1.1, atribuindo cada haplótipo com probabilidade máxima (STEPHENS et  
27 al., 2001; STEPHENS; SCHEET, 2005). O equilíbrio de Hardy-Weinberg e a  
28 estimativa do desequilíbrio de ligação por pares foi realizada no *software Haploview*  
29 versão 4.2. O desequilíbrio de ligação por pares entre os SNVs foi fornecido  
30 descrevendo o valor D e o quadrado do r. Análise de regressão logística binária ou  
31 multinomial foi realizada para avaliar o efeito das variantes genéticas no grupo de  
32 estudo e foram determinados *Odds ratio* (OR) relacionado e intervalo de confiança

1 (IC) de 95%. Para todos os testes estatísticos, foi considerado nível de significância  
2 quando  $p < 0,05$ . Análises estatísticas foram realizadas usando SPSS IBM Windows  
3 versão 24 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).  
4

## 1 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2

3 Os resultados desta dissertação foram apresentados em um artigo científico  
4 intitulado “**IL6 haplotypes structures and genotypes variants are associated with**  
5 **ankylosing spondylitis but not with IL-6 plasma levels and functional activity**  
6 **disease index**” que será submetido ao periódico Inflammation Research.

7

1 ***IL6* haplotypes structures and genotypes variants are associated with ankylosing**  
2 **spondylitis but not with IL-6 plasma levels and functional activity disease index**

3

4 Gustavo Razente Fassina<sup>1</sup>, Ana Gabriela da Silva Bonacini<sup>1</sup>, Tamires Flauzino<sup>1</sup>,  
5 Neide Tomimura Costa<sup>2</sup>, Meline Angélica Cunha Rotter Ferreira<sup>2</sup>, Fabiano Aparecido  
6 de Medeiros<sup>1</sup>, Jaqueline Costa Castardo de Paula<sup>1</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>3</sup>,  
7 Edna Maria Vissoci Reiche<sup>3</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>3</sup>.

8

- 9 1. Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina,  
10 PR, Brazil
- 11 2. Department of Rheumatology, Laboratory of Research in Applied Immunology,  
12 University of Londrina, Londrina, PR, Brazil
- 13 3. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Laboratory of  
14 Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

15

16 \* Corresponding author: Andréa Name Colado Simão. Postal address: Department  
17 of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Rua Robert Koch, n 60.  
18 University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440. Tel.: +55- 43-  
19 3371-2321; Fax: +55-43-3371-2619.

20

21

1 **ABSTRACT**

2 **BACKGROUND:** Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic immune-mediated disease  
3 characterized by inflammation of the axial skeleton. Interleukin 6 (IL-6) is involved in  
4 the pathophysiology of AS and *IL6* genetic variants could alter its levels.  
5 **OBJECTIVE:** to evaluate -572 G>C (rs1800976) and -174 G>C (rs1800975) *IL6*  
6 variants, individually and haplotype, and their association with susceptibility, cytokine  
7 levels, functional and activity disease index, and therapeutic response. **SUBJECTS**  
8 **AND METHODS:** Eighty eight patients with AS and 124 controls were recruited. Two  
9 subgroups of AS patients were distinguished in responders(n=43) and non-  
10 responders (n=11) to tumoral necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) inhibitors, after 12  
11 months of treatment. **RESULTS:** C allele of -572 G>C *IL6* variant was less frequent  
12 in AS patients (4.0%) when compared to controls (13.7%) (OR: 0.282; 95%CI: 0.112-  
13 0.706; p=0.007). The GC genotype was independently associated with protection to  
14 AS (OR: 0.339; 95%CI: 0.129-0.889; p=0.028). In addition, C/G dominant haplotype  
15 was associated with AS (OR=0.297, 95% CI 0.112-0.787, p=0.015), controlling by  
16 age, and body mass index. IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, Bath Ankylosing Spondylitis Disease  
17 Activity Index (BASDAI), and Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI)  
18 did not differ among genotypes or haplotypes. **CONCLUSION:** Our results  
19 demonstrated that GC genotype of -572 (rs1800796) of *IL6* variant and haplotype  
20 C/G in dominant model were associated with protection to AS. However, *IL6* variants  
21 were not associated with IL-6, IL-17A and TNF- $\alpha$  plasma levels, functional and  
22 activity disease index, and therapy response.

23

24 **Key words:** Ankylosing spondylitis, interleukin-6, rs1800795, rs1800796, cytokines, TNF- $\alpha$   
25 inhibitor.

26

## 1 INTRODUCTION

2

3 Ankylosing spondylitis (AS) is a common chronic immune-mediated disease  
4 characterized by inflammation of the axial skeleton. It is a type of spondyloarthritis  
5 (SpA) in which hallmark clinical features are inflammation at entheses and  
6 subchondral bone of the pelvic and spinal joints with subsequent abnormal new bone  
7 formation at these sites. Ultimately, this leads to ossification of entheses and joints  
8 resulting in loss of joint mobility. The etiology of AS is unknown but is believed to  
9 involve a combination of genetic, immunologic, and environmental factors (FAN et  
10 al., 2019; SIMONE et al., 2018). The heritability is polygenic and estimated to exceed  
11 90%, with the HLA-B27, allele as the major contributor accounting for approximately  
12 25% of the heritability of AS, a class I surface antigen encoded by B locus in the  
13 major histocompatibility complex (MHC) on the short arm of chromosome 6,  
14 (BROWN et al., 2016). HLA-B27 was reported to be present in 94.3% of patients  
15 with AS, but only 9.34% in organ donors (FERNÁNDEZ-SUEIRO et al., 2004).  
16 However, twin and family studies suggest that *HLAB27* only can explain less than  
17 30% of the overall risk for AS (BROWN et al., 1997; BROPHY et al., 2004), meaning  
18 there are other genes related with the genetic characteristics of AS.

19 Number of studies has clearly demonstrated the correlation of cytokine with AS  
20 (MEI et al., 2011; LIU et al., 2015; PRZEPIERA-BWDZAK et al., 2015). Indeed, pathways  
21 involving interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17) and tumoral necrosis factor alpha (TNF-  
22  $\alpha$ ) are suspected to contribute majorly to AS progression. Regarding the association of  
23 cytokines with the development of AS, a meta-analysis of pooled data from thirteen high-  
24 quality studies revealed a strong association between elevated IL-6 and IL-17 serum levels  
25 and the development of AS (LIU et al., 2015). In addition, studies have even linked IL-6  
26 with the inflammation and disease activity index (GRATACÓS et al, 1994, BAL et al. 2007,  
27 PRZEPIERA-BWDZAK et al. 2015).

28 Previous studies have demonstrated that -174 G>C and -572 G>C *IL6* variants  
29 could alter the IL-6 plasma levels (FISHMAN et al., 1998; FERNANDES et al. 2015) and  
30 could contribute to susceptibility and clinical parameters of AS. However, only one study  
31 evaluated -174 G>C (COLLADO- ESCOBAR et al. 2000) in AS and none evaluated -572  
32 G>C *IL6* variant in patients with this disease. In addition, there are no data about *IL6*  
33 variants associated with cytokines plasma levels in AS. Moreover, -174 G>C *IL6* gene

1 promoter variant could be a genetic marker predicting outcome of TNF- $\alpha$  inhibitor  
2 treatment (FABRIS et al., 2016). Thus, the aim of this study was to evaluate -174 G>C and  
3 -572 G>C *IL6* variants, individually and haplotype, and their association with susceptibility,  
4 cytokine plasma levels, functional and activity disease index, and therapeutic response to  
5 TNF- $\alpha$  inhibitors treatment.

## 7 **SUBJECTS AND METHODS**

### 8 *Participants*

9 Initially we carried out a prospective case-control study that included 212  
10 subjects. Eighty eight patients with diagnosed AS were consecutively recruited from  
11 the Rheumatology Clinic of the University Hospital of Londrina and 124 healthy  
12 controls (HC). The diagnosis of AS was confirmed according to modified New York  
13 criteria (LINDEN et al., 1984). Posteriorly, to investigate the association between the  
14 *IL6* genetic variants and the response of TNF- $\alpha$  inhibitors, 54 patients treated with  
15 infliximab, adalimumab or etanercept were followed for at 12 months after the  
16 beginning. Two subgroups of AS patients were then distinguished: responders (n=43)  
17 and non-responders (n=11) to TNF- $\alpha$  inhibitors therapy. It was considered  
18 therapeutic failure to use the first TNF- $\alpha$  inhibitor when after 12 months of treatment  
19 the patient had Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)  $\geq 4$   
20 (VAN DER HEIJDE et al. 2016). Patients who failed TNF- $\alpha$  inhibitors owing to  
21 adverse effects or irregular use were excluded from the study.

22 Inclusion criteria were patients of both sexes and aged from 18 to 70 years  
23 old. Exclusion criteria were the presence of other autoimmune disease, dialytic  
24 chronic renal failure, cirrhosis, hormone replacement therapy, antioxidant  
25 supplements and acute or chronic infectious diseases. Information on lifestyle  
26 factors and medical history was obtained at clinical evaluation. The individuals of  
27 both groups self-reported that they did not drink alcohol regularly. Sample collection  
28 and laboratorial analysis, as well as data evaluation, were performed in a blinded  
29 fashion. The following clinical instruments were utilized to evaluate AS patients:  
30 BASDAI (GARRET et al, 1994) and Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index  
31 (BASFI) (CUSMANICH; KOWALSKI; GALLINARO, 2012)

1 The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committees of  
2 University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 64799616.4.0000.5231). Informed  
3 consent was given by all the subjects included in this study.

#### 4 5 *Anthropometric measurements*

6 Body weight was measured, using electronic scales accurate to 0.1 kg, with  
7 patients wearing light clothings and no shoes; height was measured to a precision of  
8 0.1 cm using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)  
9 divided by height (m) squared.

#### 10 11 *Cytokines plasma levels*

12 Plasma levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17A were evaluated using a fluorescence-  
13 based detection system performed by the Luminex MAGPIX® platform (Luminex  
14 Corporation, Austin, Texas, USA).

#### 15 16 *HLA-B27 and IL6 allelic variants*

17 HLA-B27 was determined by polymerase chain reaction followed by  
18 fluorescence-based detection system performed by the Luminex MAGPIX® platform  
19 (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA).

20 Two single nucleotide variants in the promoter region of the *IL6* gene located  
21 on chromosome 7 were genotyped: -572 G>C rs1800796 at position 22726627 and -  
22 174 G>C rs1800795 at position 22727026 according to listed in the international  
23 single nucleotide polymorphism (SNP) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).  
24 Genomic DNA was extracted from a buffy coat of peripheral blood cells using a resin  
25 column procedure (PureLink Genomic DNA, Invitrogen by Life Technologies,  
26 Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. DNA samples  
27 were quantified using a NanoDrop 2000c™ spectrophotometer (ThermoScientific,  
28 Waltman, MA, USA) at 260 nm and the purity was assessed by measuring the  
29 260/280 nm ratio. The rs1800976 and rs1800975 *IL6* variants were genotyped  
30 by TaqMan allelic discrimination assay on real-time polymerase chain reaction

1 (qPCR) system (StepOne, Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, CA,  
2 USA) and performed using 0.5  $\mu$ L TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied  
3 Biosystems, Foster City, CA, USA) containing two sequence-specific primers and two  
4 allele-specific TaqMan<sup>®</sup> MGB probes with a reporter dye at its 5' end (VIC<sup>®</sup> or  
5 FAM<sup>™</sup>), 5  $\mu$ L TaqMan Universal Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), and 5  
6 ng of genomic DNA.

7

### 8 *Statistical analysis*

9           Categorical variables were evaluated by Fisher's exact test or Chi  
10 square as appropriate. Data were expressed in absolute number (n) and percentage  
11 (%). Departures from Hardy–Weinberg equilibrium and frequency differences  
12 between groups were evaluated by the Chi-square test. To verify the distribution of  
13 the data, a Shapiro-Wilk normality test was used. To evaluate the homogeneity of the  
14 variances, a Levene test was used. Data that did not show normal distribution or  
15 homogeneity of the variance were transformed into natural logarithm (Ln) and  
16 retested for normality. Parametric data were evaluated by t of Student test and  
17 expressed as mean  $\pm$  standard deviation ( $\pm$ SD). Non-parametric data were assessed  
18 by the Mann Whitney test and *IL6* and variables expressed as median and percentile  
19 (25%-75%). The association between the genetic variant was analyzed in allelic,  
20 dominant, codominant, and recessive models. Inference of recombination sites  
21 between *IL6* alleles were determined using the PHASE software version 2.1.1 by  
22 assigning each haplotype with maximum probability (STEPHENS et al., 2001;  
23 STEPHENS; SCHEET, 2005). Hardy-Weinberg equilibrium and the estimation of  
24 pairwise linkage disequilibrium (LD) were performed in Haploview software version  
25 4.2. LD between the specified SNVs was provided by describing D and r-squared  
26 value. Binary or multinomial logistic regression analysis was performed to assess the  
27 effect of the genetic variants in the study group and related odds ratio (OR) and 95%  
28 confidence interval (CI) were determined. For all statistical tests  $p < 0.05$  was  
29 considered for significance level. Statistical analyses were performed using IBM  
30 SPSS windows version 24 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

31

## 1 RESULTS

2  
3 The clinical characteristics of patients with AS are summarized in Table 1.  
4 Patients with AS are older ( $p < 0.001$ ) and have higher BMI ( $p = 0.045$ ) than controls.  
5 However, the groups did not differ regarding ethnicity ( $p = 0.110$ ) and sex ( $p = 0.652$ )  
6 when compared to controls (data not shown). The figure 1A showed that IL-6 plasma  
7 levels were increased in AS patients ( $p < 0.001$ ) when compared to HC. However, the  
8 groups did not differ ( $p > 0.05$ ) about IL-17 and TNF- $\alpha$  plasma levels when the data  
9 were adjusted by age and BMI.

10 The genotype and allele frequency of -174 G>C (rs1800795) and -572 G>C  
11 (rs1800796) of *IL6* in different genetic models were presented in Table 2.  
12 Associations were tested considering the codominant model (heterozygotes or  
13 variant homozygotes versus major allele homozygotes), dominant model  
14 (heterozygotes and variant homozygotes versus major allele homozygotes),  
15 recessive model (variant homozygotes versus major allele homozygotes and  
16 heterozygotes). In relation to rs1800795, the groups did not differ about allele and  
17 genotype frequency ( $p > 0.05$ ). However, C allele of rs1800796 *IL6* variant was less  
18 frequent in AS patients (4.0%) when compared to controls (13.7%) (OR:0.282;  
19 95%CI: 0.112-0.706;  $p = 0.007$ ). In a codominant model, the results demonstrated that  
20 the frequency of GG, GC, and CC genotypes differed between AS patients and HC  
21 (92.0 %, 8.0%, 0.0% vs 75.0%, 22.6%, 2.4%, respectively). The GC genotype was  
22 associated with AS (OR: 0.339; 95%CI: 0.129-0.889;  $p = 0.028$ ) while CC genotype  
23 was not associated (OR: not applied,  $p = 0.999$ ) compared to GG (reference  
24 genotype). The OR could not be calculated correctly due to the absence of CC  
25 genotype in the patient's group. In dominant model, GC+CC genotype was also  
26 associated with AS (OR: 0.303, 95%CI: 0.117-0.786;  $p = 0.014$ ). No association was  
27 observed with genotypes from recessive model (GG+GC versus CC;  $p = 0.999$ ). All  
28 results were adjusted by age, sex and ethnicity.

29 In figure 1B and 1C, we showed whether the genotypes of rs1800796 in dominant  
30 model (GG vs GC+CC) could interfere in cytokine plasma levels in controls and AS  
31 patients. The groups not differ in sex, age, ethnicity, BMI, and treatment (data not  
32 shown). An association between genotypes was not found in relation to IL-6, IL-17A  
33 and TNF- $\alpha$  in HC ( $p = 0.145$ ;  $p = 0.079$ ;  $p = 0.362$ , respectively) and AS patients

1 (p=0.779; p=0.762; p=0.292, respectively). The cytokines plasma levels did not differ  
2 (p>0.05) when the recessive model was tested (data not shown). In figure 2A and 2B,  
3 we demonstrated that genotype of rs1800796 in dominant model (GG vs GC+CC)  
4 was not associated with the index BASDAI (p=0.177) and BASFI (p=0.967) (Figure  
5 2A and 2B, respectively).

6 Four possible haplotype combinations from *IL6* genetic variants rs1800796 and  
7 rs1800795 were investigated in our experimental design: GG, GC, CG, and CC. The  
8 CC combination was rare (<5%) and was excluded from the analysis. The LD for the  
9 rs1800796 and rs1800795 in the *IL6* gene was quantified using Haploview by  
10 describing D and r-squared value (D'=1.0, r<sup>2</sup>=0.047 and LOD=3.3). In the association  
11 study of *IL6* haplotypes, the following models were analyzed: GG dominant (GC and  
12 CG *versus* GG carriers), GG recessive (GC and CG *versus* GGGG carriers), GC  
13 dominant (GG and CG *versus* GC carriers), GC recessive (GG and CG *versus*  
14 GCGC carriers), and CG dominant (GG and GC *versus* CG carriers). The more  
15 frequent haplotype was GG in our patient cohort, while the less frequent haplotype  
16 was G/C. In the present study, we demonstrated that C/G dominant haplotype was  
17 associated with AS (OR=0.297, 95% CI 0.112-0.787, p=0.015) estimated by binary  
18 logistic regression controlling by age, and BMI (Table 3). There was no association  
19 between haplotype model and cytokine plasma levels (p>0.05), BASDAI (p>0.05),  
20 and BASFI (p>0.05) in AS patients (data not shown).

21 In the present study, we also investigated the association between *IL6* rs1800796  
22 and rs1800795 genetics variants, individually and haplotype, and therapeutic  
23 response with the first TNF- $\alpha$  inhibitor used after 12 months of treatment. There was  
24 no association between genotypes/haplotype and response to TNF- $\alpha$  inhibitor  
25 treatment (Table 4).

26

## 1 DISCUSSION

2

3 The main finding of the present study is that the -174 G>C (rs1800795) *IL6* variant  
4 was not associated with AS but the GC genotype of -572 G>C (rs1800796) provides  
5 66% and C/G haplotype (rs1800796/rs1800795) provides about 70% of protection for  
6 AS diagnosis. In addition, those genetic variants of *IL6* were not associated with  
7 cytokine plasma levels, BASDAI, and BASFI in AS patients. Regarding treatment, -  
8 572 G>C and -174 G>C, individually or in haplotype, were not the response with  
9 success to TNF- $\alpha$  inhibitor treatment.

10 Our study showed higher IL-6 plasma levels in AS patients when compared to HC.  
11 IL-6 is a classic proinflammatory cytokine produced by a variety of immune cells and  
12 induces the production of a number of positive acute phase proteins, such as C-  
13 reactive protein. In addition, IL-6 is involved in initiation and maintenance of  
14 inflammation by facilitating neutrophil trafficking to the inflammation site and  
15 regulates T lymphocytes activation and differentiation. Our results are in agreement  
16 with findings from previous studies that also show increased IL-6 plasma levels in  
17 SpA patients (BAL et al 2007; PEDERSEN et al., 2010; SEZER et al., 2012; LIMON-  
18 CAMACHO et al., 2012; XUEYI et al., 2013; TURINA et al., 2014; PRZEPIERA-  
19 BWDZAK et al., 2015; RABELO et al., 2018). However, a study performed by  
20 Gonzalez-Lopez et al. (2017) did not find significant association between IL-6 and AS  
21 when compared patients and HC. Regarding IL-17 and TNF- $\alpha$  plasma levels, data  
22 are conflicting. Our study are in agreement with a previous study that also showed no  
23 significant difference in TNF- $\alpha$  plasma levels (VAZQUEZ-DEL MERCADO et al,  
24 2002) among AS patients and controls. Regarding IL-17A plasma levels, our data are  
25 in disagreement with previous studies. While we demonstrated that the groups did  
26 not differ about IL-17A plasma levels other studies demonstrated elevated IL-17 (MEI  
27 et al., 2011) in AS patients when compared with control group. These differences  
28 may be due to distinct study designs, ethnicity, sample size, methodology used to  
29 measure cytokines, and TNF- $\alpha$  inhibitor treatment.

30 The variant at position -174 G>C (rs1800795) of *IL6*, which is located on  
31 chromosome 7p21, is in a transcription factor binding site and can alter  
32 transcriptional process and IL-6 plasma levels (FISHMAN et al., 1998). Only one  
33 study evaluated -174 G>C *IL6* variant in AS (COLLADO- ESCOBAR et al., 2000). In

1 the present study, the groups did not differ about allelic and genotypic frequency of -  
2 174 G>C *IL6* variant. Our data are in agreement with a previous study that also failed  
3 to demonstrated association between this variant and AS (COLLADO- ESCOBAR et  
4 al., 2000). In relation to other autoimmune diseases, the findings are also  
5 controversial. A meta-analysis indicated that -174 G>C *IL6* variant was significantly  
6 associated with systemic lupus erythematosus (SLE) risk for recessive and allelic  
7 model analysis in overall studies (YANG et al., 2014). A study performed in  
8 polymyalgia rheumatica patients, showed that the -174 G/C promoter *IL6*  
9 polymorphism is not implicated in susceptibility to disease (BOIARDI et al., 2006). A  
10 study performed by Boca et al (2013) showed that the presence of C allele  
11 decreased even further the risk of psoriasis. Li et al. (2014) observed that C allele  
12 frequency was higher in rheumatic arthritis patients when compared to controls.

13 In the present study, we found that -174 G>C *IL6* variant was not associated  
14 with the three cytokine plasma levels in AS patients and HC. In addition, there was  
15 no association between genotypes and functional and activity disease index (data not  
16 show). To the best of our knowledge, there are no data available on the association  
17 of that variant and IL-6 plasma levels in AS. However, some studies investigated the  
18 association between -174 G>C *IL-6* variant and IL-6 levels in normal population and  
19 under others clinical conditions. A meta-analysis concluded that the - 174G/C *IL6*  
20 variant is not associated with circulating IL-6 levels in a normal population (HUANG  
21 et al., 2013). The -174G/C *IL6* variant was not also associated with deep vein  
22 thrombosis (DVT) (SHARMA et al, 2018) and ischemic stroke (AKHTER et al., 2019).  
23 However, another study demonstrated that GG genotype was associated with  
24 elevated IL-6 plasma levels in elderly women (PEREIRA et al., 2011). Thus, our data  
25 suggest that other factors, besides -174 G>C *IL6* variant, could modulate IL-6 plasma  
26 levels in AS patients. In addition, interaction between genetic and environmental  
27 factors should also be considered.

28 Regarding -572 G>C (rs1800796) *IL6* variant, our data showed that C allele  
29 and GC genotype decreased the susceptibility to AS, independently of age, sex, and  
30 ethnicity. As far as we know, there are no studies that evaluated the association  
31 between -572 G>C *IL6* variant and AS, only in other diseases and data are  
32 conflicting. That *IL6* variant has been considered protective factor for the presence  
33 and severity of hip and knee osteoarthritis in the elderly, and the GG genotype has

1 been associated high IL-6 serum levels (FERNANDES et al., 2015) and low levels of  
2 plasma IL-6 and low risk for chronic renal disease in a Japanese population (OKADA  
3 et al., 2012). Moreover, it was demonstrated association between -572 G>C *IL-6*  
4 variant and SLE in recessive model (JEON et al., 2010), but not in dominant model  
5 and allele analysis (HUANG et al., 2006). In addition, our data also showed that the  
6 GC genotype was not associated with IL-6, IL-17A, and TNF- $\alpha$  plasma levels in  
7 controls and AS. In addition, we did not find association between -572 G>C *IL6*  
8 variant and BASDAI or BASFI. Until now, there are no also studies that evaluated the  
9 association of the -572 G>C *IL6* variant and IL-6 plasma levels or clinical index in AS  
10 patients.

11 Genetic variants do not exist in isolation and the analysis in combination is  
12 better to understand the role of *IL6* variants in AS. Terry et al. (2000) show that *IL6*  
13 transcription is influence not only by a simple additive mechanism but through a  
14 complex interaction determined by the haplotype structures. Thus, we evaluated the  
15 haplotype structure of -572 G>C (rs1800796) and -174 G>C (rs1800795) *IL6*  
16 variants, respectively. We showed that C/G haplotype in dominant model was  
17 associated with protection for AS but not with cytokine plasma levels, and functional  
18 and activity index. In addition, our data demonstrated that *IL6* variants, individually  
19 and haplotype, were not associated with the differential response to TNF- $\alpha$  inhibitor  
20 therapy. Fabris et al. (2016) showed that the GG genotype of -174 G>C *IL6* variant  
21 (rs1800795) resulted as independent biomarkers predicting survival of the first TNF- $\alpha$   
22 inhibitor therapy in seronegative spondyloarthritis patients. The present study is  
23 different from Fabris' study (2016), in which we evaluated only AS and not other SpA  
24 and sample size. Thus, those differences could explain the discordant results.

25 Some limitations of this study should be considered. This is a case-control  
26 design, which does not allow inferences on causal relationship. The second limitation  
27 is the small number of AS. However, this study has some strength such as adjusting  
28 of variables for many confounding variables including sex, ethnicity, age, and BMI. In  
29 addition, to our knowledge, this is the first study to investigate the relationship  
30 between *IL6* variants, individually or in haplotypes, cytokine plasma levels, and  
31 clinical parameters in AS patients.

32 In conclusion, our results demonstrated that GC genotype of -572 (rs1800976)  
33 of *IL6* variant and C/G haplotype in dominant model (rs1800976/1800795) were

1 associated with protection to AS. However, -174 G>C and -572 G>C, individually or  
2 in haplotype, were not associated with cytokine plasma levels, functional and activity  
3 disease index, and the response to TNF- $\alpha$  inhibitor treatment. Further studies are  
4 needed to explain the molecular mechanisms underlying the role of the C allele of -  
5 572G>C variant for protection against AS development.

6

## 7 **ACKNOWLEDGEMENTS**

8 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
9 de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001. This study was also  
10 supported by the National Council of Brazilian Research-CNPq and by Araucária  
11 Foundation from the state of Paraná.

12

## 13 **CONFLICTS OF INTEREST**

14 The authors declare that they have no competing interests.

15

## 16 **ETHICAL APPROVAL**

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

21

## 22 **INFORMED CONSENT**

23 All the participants included in this study provided written informed consent.

24

## 25 **REFERENCES**

26 AKHTER M.S. et al. Influence of interleukin-6 (IL-6) promoter gene polymorphisms (-  
27 174 G>C, -572 G>C, and -597G>A) on IL-6 plasma levels and their impact in the  
28 development of acute ischemic stroke in young indians. **Clinical and Applied**  
29 **Thrombosis/ Hemostasis**, 25: 1-7, 2019.

30

- 1 BAL A. et al. Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with  
2 disease activity parameters in ankylosing spondylitis. **Clin Rheumatol**, 26:211–5,  
3 2007.
- 4
- 5 BOCA A.N. et al. The presence of at least one C allele in both IL12B SNP rs6887695  
6 and IL6 SNP rs1800795 and the absence of HLA-Cw6 allele decreased even further  
7 the risk of psoriasis. **Immunology Letters**, 156:127– 131,2013.
- 8
- 9 BOIARDI L. et al. Relationship between interleukin 6 promoter polymorphism at  
10 position -174, IL-6 serum levels, and the risk of relapse/recurrence in polymyalgia  
11 rheumatica. **J Rheumatol**, 33(4):703-8, 2006.
- 12
- 13 BROPHY S. et al. Concordance of disease severity among family members with  
14 ankylosing spondylitis? **J Rheumatol**, 31: 1775-1778, 2004.
- 15
- 16 BROWN M.A. et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: The role of  
17 genes, HLA, and the environment. **Arthritis Rheum**, 40: 1823-1828, 1997.
- 18
- 19 BROWN M.A., KENNA T., WORDSWORTH B.P. Genetics of ankylosing spondylitis  
20 insights into pathogenesis. **Nat Rev Rheumatol**, 12(2):81–91, 2016.
- 21
- 22 COLLADO- ESCOBAR M.D. et al. Interleukin 6 gene promoter polymorphism is not  
23 associated with ankylosing spondylitis. **J Rheumatol**, 27(6):1461-3, 2000.
- 24
- 25 CUSMANICH K.G.; KOWALSKI S.C.; GALLINARO A.L. Adaptação cultural cruzada  
26 e validação da versão do Índice Funcional de Espondilite Anquilosante de Bath  
27 (BASFI) para o português do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 52 (5):  
28 737-741, 2012.
- 29
- 30 DAVILA-FAJARDO C.L. et al. Confirmation of -174G/C interleukin-6 gene promoter  
31 polymorphism as a genetic marker predicting antitumor necrosis factor treatment outcome.  
32 **Pharmacogenet Genomics**, 24:1–5, 2013.
- 33
- 34 FABRIS. et al. The -308 TNF $\alpha$  and the -174 IL-6 promoter polymorphisms associate  
35 with effective anti-TNF $\alpha$  treatment in seronegative spondyloarthritis. **The**  
36 **Pharmacogenomics Journal**, v. 16, n. 3, p. 238–242, 2016.
- 37
- 38 FAN X. Screening of underlying genetic biomarkers for ankylosing spondylitis. **Molecular**  
39 **Medicine Reports**, 19: 5263-5274, 2019.
- 40
- 41 FERNANDES, M. T. et al. Association of interleukin-6 gene polymorphism  
42 (rs1800796) with severity and functional status of osteoarthritis in elderly individuals.  
43 **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 316–320, 2015.
- 44
- 45 FERNÁNDEZ-SUEIRO J.L. et al. Prevalence of HLA- B27 and subtypes of HLA- B27  
46 associated with ankylosing spondylitis in Galicia, Spain. **Clin Exp Rheumatol**, 22:  
47 465-468, 2004.
- 48

- 1 FISHMAN D. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-  
2 6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset  
3 juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, 102:1369–1376,1998.
- 4
- 5 GARRETT S, A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis:  
6 the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. **J Rheumatol**, 21(12):286-  
7 91,1994.
- 8
- 9 GRATACÓS J et al. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma)  
10 in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity  
11 and severity. **Br J Rheumatol**, 33(10):927-31. 1994.
- 12
- 13 GODARZI E.M. et al. Interleukin-6 gene polymorphism in Iranian patients with  
14 systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol**,30:179–84, 2011.
- 15
- 16 GONZALEZ-LOPEZ L et al. Association of adipokines, interleukin-6, and tumor  
17 necrosis factor-a concentrations with clinical characteristics and presence of spinal  
18 syndesmophytes in patients with ankylosing spondylitis: A cross-sectional study.  
19 **Journal of International Medical Research**, 45(3) 1024–1035, 2017.
- 20
- 21 HUANG C.M. et al. Lack of association of interleukin-6 and interleukin-8 gene  
22 polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **J Clin Lab**  
23 **Anal** , 20:255–259, 2006.
- 24
- 25 HUANG M ET AL. Lack of an association between interleukin-6 – 174G/C  
26 polymorphism and circulating interleukin-6 levels in normal population:a meta-  
27 analysis. **DNA and Cell Biology**, 32:11, 2013.
- 28
- 29 JEON J.Y. et al. Interleukin 6 gene polymorphisms are associated with systemic  
30 lupus erythematosus in Koreans. **J Rheumatol**, 37:2251–2258, 2010.
- 31
- 32 LI, X. et al. The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the  
33 susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. **BioMed Research**  
34 **International**, v. 2014, 2014
- 35
- 36 LIMON-CAMACHO L. et al. In vivo peripheral blood proinflammatory T cells in patients  
37 with ankylosing spondylitis. **J Rheumatol** ,39: 830-5, 2012.
- 38
- 39 LINDEN S.V.D, VALKENBURG H.A., CATS A. Evaluation of diagnostic criteria for  
40 ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. **Arthritis**  
41 **Rheum**, 27:361–368,1984.
- 42
- 43 LIU W. et al. Elevated serum levels of IL-6 and IL-17 may associate with the  
44 development of ankylosing spondylitis. **Int J Clin Exp Med**, 8(10):17362-17376,  
45 2015.
- 46
- 47 MACHIELA MJ, CHANOCK SJ. A web-based application for exploring population-specific  
48 haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants.  
49 **Bioinformatics** 31:3555–3557.
- 50

- 1 MEI Y. et al. Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis.  
2 **Clin Rheumatol**,30: 269-73,2011.
- 3
- 4 OKADA, R. et al. Pro-/anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms and chronic  
5 kidney disease: a cross-sectional study. **BMC Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 2, 2012.
- 6
- 7 PEDERSEN S.J. Circulating levels of interleukin-6, vascular endothelial growth  
8 factor, YKL-40, matrix metalloproteinase-3, and total aggrecan in spondyloarthritis  
9 patients during 3 years of treatment with TNF alpha inhibitors. **Clin Rheumatol**,  
10 29:1301–9, 2010.
- 11
- 12 PEREIRA D.S. et al. Effects of -174 g/c polymorphism in the promoter region of the  
13 interleukin-6 gene on plasma IL-6 levels and muscle strength in elderly women.  
14 **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 44: 123-129, 2011.
- 15
- 16 PRZEPIERA-BWDZAK H. et al. Serum IL-6 and IL-23 Levels and their correlation  
17 with angiogenic cytokines and disease activity in ankylosing spondylitis, psoriatic  
18 arthritis, and SAPHO Syndrome. **Mediators of Inflammation**, 2015: 785705, 2015.
- 19
- 20 RABELO C.F et al. Serum IL-6 correlates with axial mobility index (Bath Ankylosing  
21 Spondylitis Metrology Index) in Brazilian patients with ankylosing spondylitis.  
22 **Research and Reviews**, 2018.
- 23
- 24 SEZER, U. et al. Serum cytokine levels and periodontal parameters in ankylosing  
25 spondylitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 3, p. 396–401, 2012.
- 26
- 27 SHARMA A et al. Impact of interleukin 6 promoter polymorphisms (–174 G > C, –572  
28 G > C AND –597 G > A) on plasma il-6 levels and their influence on the development  
29 of DVT: a study from india. **Hematology**,23, 10:833–838, 2018.
- 30
- 31 Simone D, Al Mossawi M.H., Bowness P. Progress in our understanding of the  
32 pathogenesis of ankylosing spondylitis. **Rheumatology** 2018;57:vi4\_vii9
- 33 SOLÉ X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies.  
34 **Bioinformatics** 22:1928–1929, 2006.
- 35
- 36 TERRY C.F., LOUKACI V., GREEN F.R. Cooperative influence of genetic  
37 polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **J Biol Chem**, 275:18138–  
38 18144, 2000.
- 39
- 40 TURINA M.C et al. Calprotectin (S100A8/9) as serum biomarker for clinical response  
41 in proof-of-concept trials in axial and peripheral spondyloarthritis. **Arthritis Res Ther**,  
42 16:413, 2014.
- 43
- 44 VAN DER HEIJDE, D. et al. 2016 update of the ASAS-EULAR management  
45 recommendations for axial spondyloarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.  
46 76, n. 6, p. 978–991, 2017.
- 47
- 48 VAZQUEZ-DEL MERCADO M. et al. Interleukin 1beta (IL-1beta), IL-10, tumor  
49 necrosis factor-alpha, and cellular proliferation index in peripheral blood mononuclear  
50 cells in patients with ankylosing spondylitis. **J Rheumatol**, 29(3):522–526, 2002.

- 1  
2 XIA Y, Association between cytokine gene polymorphisms and ankylosing spondylitis  
3 susceptibility: a systematic review and meta-analysis. **Postgrad Med J**, 94:508–516,  
4 2018.  
5  
6 XUEYI L.et al. Levels of circulating Th17 cells and regulatory T cells in ankylosing  
7 spondylitis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. **J Clin**  
8 **Immunol**, 33:151–61, 2013.  
9  
10 YANG Z et al. A meta-analysis of the association of IL-6 -174 G/C and -572 G/C  
11 polymorphisms with systemic lupus erythematosus risk. **Rheumatol Int**, 34:199–205,  
12 2014.  
13  
14

1 **Table 1. Sociodemographic and clinical data of patients with ankylosing**  
 2 **spondylitis (AS)**

Characteristics	n=88
<b>Age</b> (year)	49.0 (14.0)
<b>Ethnicity</b>	
Caucasian (%)	75 (88.2)
Not Caucasian (%)	10 (11.8)
<b>Sex</b>	
Female (%)	37 (42.0)
Male (%)	51 (58.0)
<b>HLA B-27</b>	
Negative (%)	34 (49.3)
Positive (%)	35 (50.7)
<b>BASDAI</b>	
Inactive (<4) (%)	27 (31.4)
Active (≥4) (%)	59 (68.6)
<b>BASFI Score</b>	6 [2 – 8]
<b>Treatment</b>	
<b>TNF-α Inhibitor</b>	
No (%)	22 (25.0)
Yes (%)	66 (75.0)
<b>IL-17 Inhibitor</b>	
No (%)	86 (97.7)
Yes (%)	2 (2.3)
<b>Other immunosuppressors</b>	
No (%)	44 (50.0)
Yes (%)	44 (50.0)

3 Data are expressed as absolute number and percentage (%). Data are  
 4 expressed as mean, ± standard deviation (±SD) or median [interquartile  
 5 range]. BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index;  
 6 BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; TNF-α: Tumor  
 7 Necrosis Factor alpha; IL-17: interleukin-17. Other immunosuppressors:  
 8 Metotrexate, sulfasalazine.

1 **Table 2. Association of rs1800795 and rs1800796 genotypes and allelic**  
 2 **frequencies in patients with Ankylosing Spondylitis (AS) and healthy controls**  
 3 **(HC)**

	Model	HC n=124 (%)	AS n=88 (%)	OR (95% CI)	p value*
<b>rs1800795</b> -174 G>C <i>IL6</i>	Allelic				
	G	183 (73.8)	126 (71.6)	Reference	-
	C	65 (26.2)	50 (28.4)	1.130 (0.671-1.905)	0.645
	Codominant				
	GG	65 (52.4)	46 (52.3)	Reference	-
	GC	53 (42.7)	34 (38.6)	0.983 (0.518-1.867)	0.958
	CC	6 (4.8)	08 (9.1)	2.105(0.594-7.459)	0.249
	Dominant				
	GG	65 (52.4)	46 (52.3)	Reference	-
	GC+CC	59 (47.6)	42 (47.7)	1.092 (0.591-2.017)	0.778
	Recessive				
GG+GC	118 (95.2)	80 (90.9)	Reference	-	
CC	6 (4.8)	08 (9.1)	2.121 (0.618-7.284)	0.232	
<b>rs1800796</b> -572 G>C <i>IL6</i>	Allelic				
	G	214 (86.3)	169 (96.0)	Reference	-
	C	34 (13.7)	7 (4.0)	0.282 (0.112-0.706)	<b>0.007</b>
	Co-dominant				
	GG	93 (75.0)	81 (92.0)	Reference	-
	GC	28 (22.6)	7 (8.0)	0.339 (0.129-0.889)	<b>0.028</b>
	CC	03 (2.4)	0 (0.0)	NA	0.999
	Dominant				
	GG	93 (75)	81 (92)	Reference	-
	GC+CC	31 (25.0)	07 (8)	0.303 (0.117-0.786)	<b>0.014</b>
	Recessive				
GG+GC	121 (97.6)	88 (100)	Reference	-	
CC	03 (2.4)	0 (0.0)	NA	0.999	

4 Logistic regression. Data were expressed as absolute number and percentage (%).

5 OR: odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval. IL-6: interleukin-6. NA: Not applied.

6 \*p adjusted by age, sex and ethnicity.

7

1 **Table 3. Distribution of rs1800795 and rs1800796 *IL6* variant haplotypes in**  
 2 **patients with Ankylosing Spondylitis (AS) and healthy controls (HC)**

Haplotypes (rs1800796/rs1800795)	HC n (%)	AS n (%)	OR (95% CI)	P value
G/G dominant	102 (82.3)	80 (90.9)	2.208 (0.802-6.074)	0.125
G/G recessive	47 (37.9)	39 (44.3)	1.269 (0.652-2.466)	0.483
G/C dominant	59 (47.6)	42 (47.7)	0.992 (0.514-1.914)	0.980
G/C recessive	6 (4.8)	8 (9.1)	2.521 (0.580-10.949)	0.217
C/G dominant	31 (25.0)	7 (8.0)	0.297 (0.112-0.787)	<b>0.015</b>

3

4 OR (odds ratio) and 95% CI (confidence interval) estimated by binary logistic  
 5 regression controlling by age and body mass index. Reference genetic model  
 6 employed in this analysis was the corresponding genetic model: GG dominant  
 7 (GC and CG *versus* GG carriers), GG recessive (GC and CG *versus* GGGG  
 8 carriers), GC dominant (GG and CG *versus* GC carriers), GC recessive (GG and  
 9 CG *versus* GCGC carriers), and CG dominant (GG and GC *versus* CG carriers).

10

11

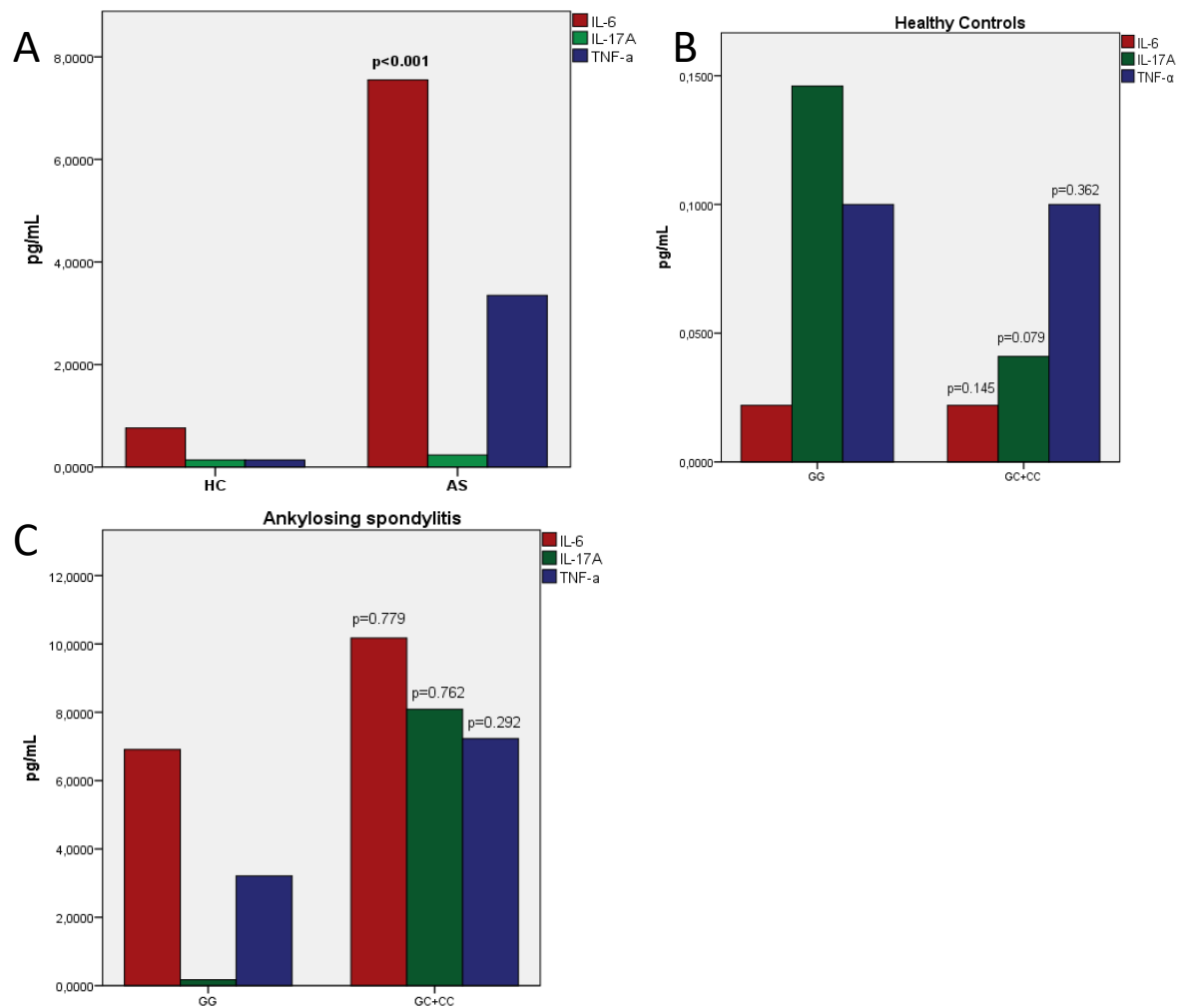
1  
2**Table 4. Results of the genetic studies in ankylosing spondylitis patients according TNF- $\alpha$  inhibitor response after 12 months**

Genetic variant	Genotype	NSw (%)	Sw (%)	OR (95% CI)	p value
<b><i>IL-6 -174</i></b>	GG	23 (56.1)	5 (41.7)	Reference	-
	GC+CC	18 (43.0)	6 (54.5)	0.716 (0.134-3.825)	0.696
<b><i>IL-6 -572</i></b>	GG	37 (90.2)	10 (90.9)	Reference	-
	GC+CC	4 (9.8)	1 (9.1)	2.829 (0.180-44.506)	0.460
<b>rs1800796/ rs1800795</b>	<b>Haplotypes</b>				
	G/G dominant (Yes)	40 (97.6)	11 (100)	148120442.5 (0.000-0.000)	1.000
	G/G recessive (Yes)	19 (46.3)	4 (36.4)	1.007 (0.186-5.445)	0.994
	G/C dominant (Yes)	18 (43.9)	6 (54.5)	0.716 (0.134-3.825)	0.696
	G/C recessive (Yes)	1 (2.4)	0 (0.0)	0.000 (0.00-0.000)	1.000
	C/G dominant (Yes)	4 (9.8)	1 (9.1)	2.829 (0.180-44.506)	0.460

3  
4  
5  
6

OR: odds ratio; CI: confidence interval; IL-6: interleukin-6; NSw: not needing to switch after 12 months; Sw: needing to switch after 12 months. The rarest homozygosis of the IL-6 (CC) polymorphisms were aggregated to the heterozygosis owing to the very low prevalence in the overall population. \* p adjusted by age, sex and ethnicity.

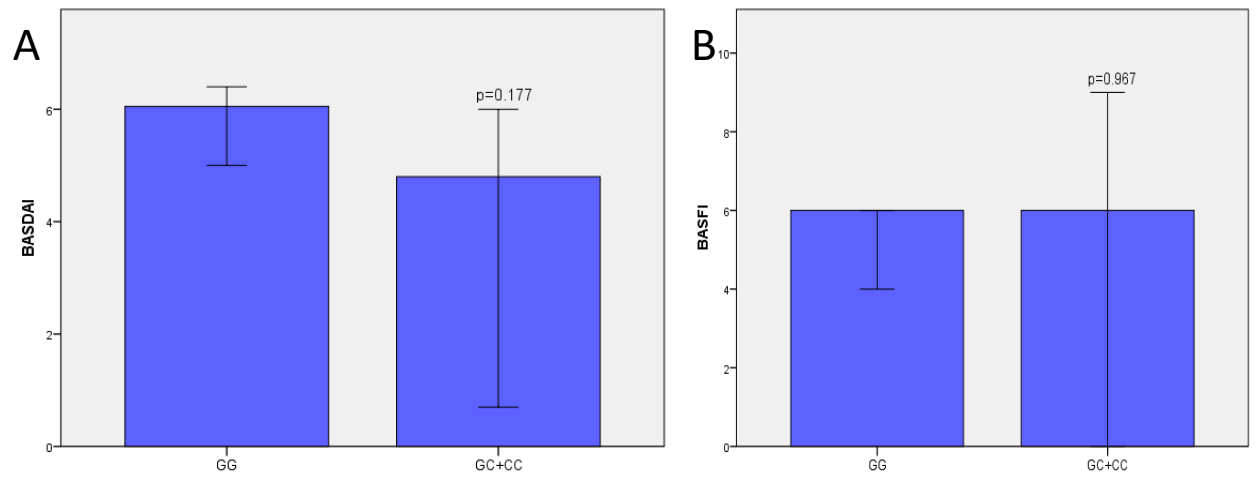
1



2

**Figure 1. Cytokine plasma levels. A) Ankylosing spondylitis (AS) patients vs healthy controls (HC); B) In relation to rs1800796 -572 G>C *IL6* genotype in HC; C) In relation to rs1800796 -572 G>C *IL6* genotype in AS patients.** Data are shown as mean. IL-6: interleukin-6; IL-17A: interleukin-17A; TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha. Data are shown as median, data adjusted for age and body mass index.

3



**Figure 2. Ankylosing Spondylitis Index in relation to genotype of -572 G>C (rs1800796) *IL6* variant. A) Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index scores; B) Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index scores. Data are shown as mean, and 95% Confidence Interval.**

## 1 6. CONCLUSÕES

2

3 - Pacientes com EA e controles não diferiram quanto à frequência alélica e  
4 genotípica da variante -174 G>C (rs1800795) do *IL6*. No entanto, pacientes com EA  
5 apresentaram menor frequência do alelo C (modelo alélico) e do genótipo GC  
6 (modelo codominante e dominante) da variante -572 G> do *IL6* quando comparados  
7 ao grupo controle.

8 - A presença do alelo C da variante -572 G>C do *IL6*, em homozigose ou  
9 heterozigose, ou ainda do haplótipo C/G (modelo dominante) confere cerca de 70%  
10 de proteção para o desenvolvimento de EA.

11 - Os níveis plasmáticos de IL-6 foram maiores em pacientes com EA do que em  
12 indivíduos controles enquanto os níveis de IL-17A e TNF- $\alpha$  não diferiram entre os  
13 grupos, independentemente das variáveis confundidoras (sexo, idade, etnia e IMC).

14 - Os níveis das citocinas IL-6, IL-17A e TNF- $\alpha$  não foram associados aos genótipos e  
15 haplótipo das variantes -174 G>C e -572 G>C do *IL6*, nos diferentes modelos  
16 genéticos analisados.

17 - As variantes do *IL6* avaliadas, individualmente ou em haplótipo em diferentes  
18 modelos genéticos, não foram associadas aos índices de atividade (BASDAI) e de  
19 funcionalidade (BASFI).

20 - Não houve associação entre as variantes genéticas avaliadas, individualmente ou  
21 em haplótipo, e a resposta terapêutica ao uso de inibidores do TNF- $\alpha$  em pacientes  
22 com EA.

23

## 1 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

2

3 Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. A  
4 principal delas é que se trata de um estudo de caso- controle, o que não permite  
5 inferências sobre relações causais. Além disso, a etnia dos pacientes foi  
6 autodeclarada e o delineamento foi baseado em uma única medida basal de  
7 citocinas e apenas dois SNVs, o que exclui outros fatores que poderiam impactar  
8 nos níveis de citocinas, especialmente da IL-6. No entanto, nosso estudo apresenta  
9 alguns pontos fortes, como por exemplo, a avaliação em haplótipos das duas  
10 variantes e o controle dos resultados obtidos pelos vários fatores confundidores que  
11 poderiam prejudicar a interpretação dos dados obtidos.

12 Este é o primeiro estudo a avaliar a variante -174 G>C do *IL6* na população  
13 brasileira com EA. Além disso, não há estudos até o presente momento que tenham  
14 avaliado a variante -572 G>C do *IL6* em pacientes com EpA. Este, também é o  
15 primeiro estudo a avaliar a associação destas variantes em haplótipos com a  
16 suscetibilidade, a atividade da doença e resposta terapêutica aos inibidores de  
17 TNF- $\alpha$  em pacientes com EA. Nossos dados sugerem que a variante -572 G>C  
18 herdada individualmente ou em haplótipo com a variante -174 G>C seja um fator  
19 protetor para EA, mas que não pode predizer os níveis de citocinas, a atividade da  
20 doença e a resposta terapêutica ao uso de inibidores de TNF.

21

## 1 8. BIBLIOGRAFIA

- 2 AKHTER, M. S. et al. Influence of Interleukin-6 (IL-6) Promoter Gene Polymorphisms  
3 (-174G>C, -572G>C, and -597G>A) on IL-6 Plasma Levels and Their Impact in the  
4 Development of Acute Ischemic Stroke in Young Indians. **Clinical and Applied**  
5 **Thrombosis/Hemostasis**, v. 25, p. 1-7, 2019.
- 6
- 7 ASADBEIK, M. et al. Gene expression profile of proinflammatory cytokines in Iranian  
8 patients with ankylosing spondylitis. **Rheumatology Research**, v. 2, n. 1, p. 31–38,  
9 2017.
- 10
- 11 BAECHER-ALLAN, C.; VIGLIETTA, V.; HAFLER, D. A. Inhibition of Human CD4 +  
12 CD25 +high Regulatory T Cell Function . **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11,  
13 p. 6210–6217, 2002.
- 14
- 15 BAL, A. et al. Comparison of serum IL-1 $\beta$ , sIL-2R, IL-6, and TNF- $\alpha$  levels with  
16 disease activity parameters in ankylosing spondylitis. **Clinical Rheumatology**, v. 26,  
17 n. 2, p. 211–215, 2007.
- 18
- 19 BRAUN, JÜR. et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in  
20 the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing  
21 spondylitis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 4, p. 499–505, 1995.
- 22
- 23 BREWERTON, D. A. et al. Ankylosing Spondylitis and HL-A27. **The Lancet**, v. 301,  
24 n. 7809, p. 904–907, 1973.
- 25
- 26 BRIDGEWOOD, C. et al. Spondyloarthritis: new insights into clinical aspects,  
27 translational immunology and therapeutics. **Current Opinion in Rheumatology**, v.  
28 30, n. 5, p. 526–532, 2018.
- 29
- 30 BROPHY, S. et al. Concordance of disease severity among family members with  
31 ankylosing spondylitis? **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 9, p. 1775–8, set.  
32 2004.
- 33
- 34 BROWN, M. A. et al. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to  
35 ankylosing spondylitis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 59, n. 11, p. 883–  
36 886, 2000.
- 37
- 38 BROWN, M. A.; KENNA, T.; WORDSWORTH, B. P. Genetics of ankylosing  
39 spondylitis - Insights into pathogenesis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 2,  
40 p. 81–91, 2016.
- 41
- 42 COLLADO-ESCOBAR, M. D. et al. Interleukin 6 gene promoter polymorphism is not  
43 associated with ankylosing spondylitis. **The Journal of Rheumatology**, v. 27, n. 6, p.  
44 1461–3, jun. 2000.
- 45
- 46 COLLANTES-ESTEVEZ, E. et al. New criteria for inflammatory back pain in patients  
47 with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of  
48 SpondyloArthritis international Society (ASAS). **Annals of the Rheumatic Diseases**,  
49 v. 68, n. 6, p. 784–788, 2009.

- 1 CUBINO, N. et al. Association of IL1B (-511 A/C) and IL6 (-174 G > C)  
2 polymorphisms with higher disease activity and clinical pattern of psoriatic arthritis.  
3 **Clinical Rheumatology**, v. 35, n. 7, p. 1789–1794, 2016.  
4
- 5 CUI, Y. X. et al. Association of the interleukin-6 polymorphisms with systemic lupus  
6 erythematosus: A meta-analysis. **Lupus**, v. 24, n. 12, p. 1308–1317, 2015.  
7
- 8 CUSMANICH, K. G.; KOWALSKI, S. C.; GALLINARO, A. L. Adaptação cultural  
9 cruzada e validação da versão do Índice Funcional de Espondilite Anquilosante de  
10 Bath (BASFI) para o português do Brasil. v. 52, n. 5, p. 4–8, 2012.  
11
- 12 DE LIMA, C. A. D. et al. Are key cytokines genetic and serum levels variations  
13 related to rheumatoid arthritis clinical severity? **Gene**, v. 722, n. March 2019, p.  
14 144098, 2019.  
15
- 16 DE WINTER, J. J. et al. Prevalence of peripheral and extra-articular disease in  
17 ankylosing spondylitis versus non-radiographic axial spondyloarthritis: A meta-  
18 analysis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2016.  
19
- 20 DEAN, L. E. et al. Global prevalence of ankylosing spondylitis. **Rheumatology**  
21 **(United Kingdom)**, v. 53, n. 4, p. 650–657, 2014.  
22
- 23 DUAN, Z. et al. The immune dysfunction in ankylosing spondylitis patients.  
24 **BioScience Trends**, v. 11, n. 1, p. 69–76, 2017.  
25
- 26 DUBA, A. S.; MATHEW, S. D. The Seronegative Spondyloarthropathies. **Primary**  
27 **Care - Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 2, p. 271–287, 2018.  
28
- 29 EL MAGHRAOUI, A.; DEHHAOUI, M. Prevalence and Characteristics of Lung  
30 Involvement on High Resolution Computed Tomography in Patients with Ankylosing  
31 Spondylitis: A Systematic Review. **Pulmonary Medicine**, v. 2012, p. 1–5, 2012.  
32
- 33 ERIKSSON, J. K. et al. Is ankylosing spondylitis a risk factor for cardiovascular  
34 disease, and how do these risks compare with those in rheumatoid arthritis? **Annals**  
35 **of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 2, p. 364–370, 2017.  
36
- 37 FABRIS, M. et al. The-308 TNF $\alpha$  and the -174 IL-6 promoter polymorphisms  
38 associate with effective anti-TNF $\alpha$  treatment in seronegative spondyloarthritis.  
39 **Pharmacogenomics Journal**, v. 16, n. 3, p. 238–242, 2016.  
40
- 41 FALKENBACH, A.; HEROLD, M.; WIGAND, R. Interleukin-6 serum concentration in  
42 ankylosing spondylitis: A reliable predictor of disease progression in the subsequent  
43 year? **Rheumatology International**, v. 19, n. 4, p. 149–151, 2000.  
44
- 45 FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene  
46 on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset  
47 juvenile chronic arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, p. 1369–  
48 1376, 1998.  
49

- 1 FRANÇOIS, R. J. et al. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies  
2 of patients with ankylosing spondylitis: Detection of tumour necrosis factor  $\alpha$  in two  
3 patients with early disease and transforming growth factor  $\beta$  in three more advanced  
4 cases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 6, p. 713–720, 2006.
- 5
- 6 GRATACÓS, J. et al. Serum cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ ) in ankylosing  
7 spondylitis: A close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity.  
8 **Rheumatology**, v. 33, n. 10, p. 927–931, 1994.
- 9
- 10 HARVARD, S. et al. Access criteria for anti-TNF agents in spondyloarthritis: Influence  
11 on comparative 1-year cost-effectiveness estimates. **Cost Effectiveness and**  
12 **Resource Allocation**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2017.
- 13
- 14 HAYER, S. et al. Interleukin 6 is not a crucial regulator in an animal model of tumour  
15 necrosis factor-mediated bilateral sacroiliitis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.  
16 69, n. 7, p. 1403–1406, 2010.
- 17
- 18 HEALY, P. J.; HELLIWELL, P. S. Classification of the spondyloarthropathies.  
19 **Current Opinion in Rheumatology**, v. 17, n. 4, p. 395–399, 2005.
- 20
- 21 HOLBROOK, J. et al. Tumour necrosis factor signalling in health and disease.  
22 **F1000Research**, v. 8, p. 1–12, 2019.
- 23
- 24 HREGGVIDSDOTTIR, H. S.; NOORDENBOS, T.; BAETEN, D. L. Inflammatory  
25 pathways in spondyloarthritis. **Molecular Immunology**, v. 57, n. 1, p. 28–37, 2014.
- 26
- 27 HUANG, M. et al. Lack of an association between interleukin-6-174G/C  
28 polymorphism and circulating interleukin-6 levels in normal population: A meta-  
29 analysis. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 11, p. 654–664, 2013.
- 30
- 31 HULKKONEN, J. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter  
32 region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate  
33 with the clinical manifestations of the disease. **Rheumatology**, v. 40, n. 6, p. 656–  
34 661, 2001.
- 35
- 36 IMANI, D. et al. Association between IL6-174 G/C polymorphism and Graves'  
37 disease: A systematic review and meta-analysis. **Acta Medica Iranica**, v. 55, n. 11,  
38 p. 665–671, 2017.
- 39
- 40 JACQUES, P. et al. Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a  
41 multiparametric predictive model. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 3, p.  
42 414–417, 2012.
- 43
- 44 JENNINGS, F.; LAMBERT, E.; FREDERICSON, M. Rheumatic diseases presenting  
45 as sports-related injuries. **Sports Medicine**, v. 38, n. 11, p. 917–930, 2008.
- 46
- 47 KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and  
48 emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 49–  
49 62, 2016.
- 50

- 1 KHAN, M. A.; VAN DER LINDEN, S. M. A wider spectrum of spondyloarthropathies.  
2 **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 20, n. 2, p. 107–113, out. 1990.  
3
- 4 LEE, Y. H. et al. The association between interleukin-6 polymorphisms and systemic  
5 lupus erythematosus: A meta-analysis. **Lupus**, v. 21, n. 1, p. 60–67, 2012.  
6
- 7 LIMÓN-CAMACHO, L. et al. In vivo peripheral blood proinflammatory T cells in  
8 patients with ankylosing spondylitis. **Journal of Rheumatology**, v. 39, n. 4, p. 830–  
9 835, 2012.  
10
- 11 LINDEN, S. VAN DER; VALKENBURG, H. A.; CATS, A. Evaluation of Diagnostic  
12 Criteria for Ankylosing Spondylitis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 27, n. 4, p. 361–  
13 368, 1984.  
14
- 15 LINDSTRÖM, U. et al. Biological treatment of ankylosing spondylitis: a nationwide  
16 study of treatment trajectories on a patient level in clinical practice. **Arthritis  
17 Research & Therapy**, v. 21, n. 1, p. 128, 28 maio 2019.  
18
- 19 LIU, K. G. et al. Expression of TNF- $\alpha$ , VEGF, and MMP-3 mRNAs in synovial tissues  
20 and their roles in fibroblast-mediated osteogenesis in ankylosing spondylitis.  
21 **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 6852–6858, 2015a.  
22
- 23 LIU, W. et al. Elevated serum levels of IL-6 and IL-17 may associate with the  
24 development of ankylosing spondylitis. **International Journal of Clinical and  
25 Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 17362–17376, 2015b.  
26
- 27 LORENTE, L. et al. Association between interleukin-6 promoter polymorphism (-174  
28 G/C), serum interleukin-6 levels and mortality in severe septic patients. **International  
29 Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1–10, 2016.  
30
- 31 MACHADO, P. et al. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS):  
32 Defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. **Annals of  
33 the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 1, p. 47–53, 2011.  
34
- 35 MITOMA, H. et al. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents –  
36 Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists. **Cytokine**, v. 101, p. 56–63,  
37 2018.  
38
- 39 MOLL, J. M. H. et al. ASSOCIATIONS BETWEEN ANKYLOSING SPONDYLITIS,  
40 PSORIATIC ARTHRITIS, REITER'S DISEASE, THE INTESTINAL  
41 ARTHROPATHIES, AND BEHCET'S SYNDROME. **Medicine**, v. 53, n. 5, p. 343–  
42 364, set. 1974.  
43
- 44 NOSSENT, J. C.; SAGEN-JOHNSEN, S.; BAKLAND, G. Disease Activity and  
45 Patient-Reported Health Measures in Relation to Cytokine Levels in Ankylosing  
46 Spondylitis. **Rheumatology and Therapy**, v. 6, n. 3, p. 369–378, 2019.  
47
- 48 OKADA, R. et al. Pro-/anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms and chronic  
49 kidney disease: a cross-sectional study. **BMC Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 2, 2012.  
50

- 1 PEREIRA, D. S. et al. Effects of -174 G/C polymorphism in the promoter region of the  
2 interleukin-6 gene on plasma IL-6 levels and muscle strength in elderly women.  
3 **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 2, p. 123–129,  
4 2011.
- 5  
6 PÉREZ ALAMINO, R. et al. Differential features between primary ankylosing  
7 spondylitis and spondylitis associated with psoriasis and inflammatory bowel disease.  
8 **Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 8, p. 1656–1660, 2011.
- 9  
10 PRZEPIERA-BĘDZAK, H.; FISCHER, K.; BRZOSKO, M. Serum IL-6 and IL-23 levels  
11 and their correlation with angiogenic cytokines and disease activity in ankylosing  
12 spondylitis, psoriatic arthritis, and SAPHO Syndrome. **Mediators of Inflammation**, v.  
13 2015, p. 785705, 2015.
- 14  
15 RABELO, C. F. et al. Serum IL-6 correlates with axial mobility index (Bath ankylosing  
16 spondylitis metrology index) in Brazilian patients with ankylosing spondylitis. **Open**  
17 **Access Rheumatology: Research and Reviews**, v. 10, p. 21–25, 2018.
- 18  
19 RANGANATHAN, V. et al. Pathogenesis of ankylosing spondylitis-recent advances  
20 and future directions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 6, p. 359–367,  
21 2017.
- 22  
23 RAYCHAUDHURI, S. P. Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. **Clinical**  
24 **Reviews in Allergy & Immunology**, v. 44, n. 2, p. 183–193, 24 abr. 2013.
- 25  
26 REVEILLE, J. D. Recent studies on the genetic basis of ankylosing spondylitis.  
27 **Current Rheumatology Reports**, v. 11, n. 5, p. 340–348, 2009.
- 28  
29 REVEILLE, J. D. et al. The prevalence of HLA-B27 in the US: Data from the US  
30 National Health and Nutrition Examination Survey, 2009. **Arthritis and Rheumatism**,  
31 v. 64, n. 5, p. 1407–1411, 2012.
- 32  
33 REVEILLE, J. D.; WEISMAN, M. H. The epidemiology of back pain, axial  
34 spondyloarthritis and HLA-B27 in the United States. **American Journal of the**  
35 **Medical Sciences**, v. 345, n. 6, p. 431–436, 2013.
- 36  
37 RUDWALEIT, M. et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis  
38 international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II):  
39 Validation and final selection. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 6, p.  
40 777–783, 2009.
- 41  
42 RUDWALEIT, M. et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society  
43 classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in  
44 general. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 1, p. 25–31, 2011.
- 45  
46 SAMPAIO-BARROS, P. D. et al. Primary ankylosing spondylitis: Patterns of disease  
47 in a Brazilian population of 147 patients. **Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 3, p.  
48 560–565, 2001.
- 49

- 1 SAVAGE, L. et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies  
2 non-MHC susceptibility loci. **Nature Genetics**, v. 42, n. 2, p. 123–127, 2010.
- 3 SEZER U et al. Serum cytokine levels and periodontal parameters in ankylosing  
4 spondylitis. **J Periodont Res**, 2012
- 5
- 6 SHINJO, S. K.; GONÇALVES, R.; GONÇALVES, C. R. Medidas de avaliação clínica  
7 em pacientes com espondilite anquilosante: revisão da literatura. **Revista Brasileira**  
8 **de Reumatologia**, v. 46, n. 5, p. 340–346, 2006.
- 9
- 10 SIEPER, J. et al. Ankylosing spondylitis: an overview. **Annals of the rheumatic**  
11 **Diseases**, v. 61 Suppl 3, p. iii8-18, dez. 2002.
- 12
- 13 SIEPER, J. et al. Assessment of short-term symptomatic efficacy of tocilizumab in  
14 ankylosing spondylitis: Results of randomised, placebo-controlled trials. **Annals of**  
15 **the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 1, p. 95–100, 2014.
- 16
- 17 SIEPER, J. et al. Sarilumab for the treatment of ankylosing spondylitis: Results of a  
18 Phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled study (ALIGN). **Annals of the**  
19 **Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 6, p. 1051–1057, 2015.
- 20
- 21 SIMONE, D.; AL MOSSAWI, M. H.; BOWNESS, P. Progress in our understanding of  
22 the pathogenesis of ankylosing spondylitis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v.  
23 57, n. 6, p. 4–9, 2018.
- 24
- 25 SVEAAS, S. H. et al. Circulating levels of inflammatory cytokines and cytokine  
26 receptors in patients with ankylosing spondylitis: A cross-sectional comparative  
27 study. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 44, n. 2, p. 118–124, 2015.
- 28
- 29 TAUROG, J. D.; CHHABRA, A.; COLBERT, R. A. Ankylosing Spondylitis and Axial  
30 Spondyloarthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 26, p. 2563–  
31 74, 30 jun. 2016.
- 32
- 33 TAYLAN, A. et al. Evaluation of the T helper 17 axis in ankylosing spondylitis.  
34 **Rheumatology International**, v. 32, n. 8, p. 2511–2515, 2012.
- 35
- 36 TERRY, C. F.; LOUKACI, V.; GREEN, F. R. Cooperative influence of genetic  
37 polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **The Journal of biological**  
38 **chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18138–44, 16 jun. 2000.
- 39
- 40 VAN DER HEIJDE, D. et al. 2016 update of the ASAS-EULAR management  
41 recommendations for axial spondyloarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.  
42 76, n. 6, p. 978–991, 2017.
- 43
- 44 VAN MENS, L. J. J. et al. Brief Report: Interleukin-17 Blockade With Secukinumab in  
45 Peripheral Spondyloarthritis Impacts Synovial Immunopathology Without  
46 Compromising Systemic Immune Responses. **Arthritis and Rheumatology**, v. 70, n.  
47 12, p. 1994–2002, 2018.
- 48

- 1 VISVANATHAN, S. et al. Inflammatory biomarkers, disease activity and spinal  
2 disease measures in patients with ankylosing spondylitis after treatment with  
3 infliximab. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 4, p. 511–517, 2008.  
4
- 5 WATAD, A. et al. The early phases of ankylosing spondylitis: Emerging insights from  
6 clinical and basic science. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–9, 2018.  
7
- 8 ZEBOULON, N.; DOUGADOS, M.; GOSSEC, L. Prevalence and characteristics of  
9 uveitis in the spondyloarthropathies: A systematic literature review. **Annals of the**  
10 **Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 7, p. 955–959, 2008.  
11
- 12 ZEIDLER, H.; CALIN, A.; AMOR, B. A historical perspective of the spondyloarthritis.  
13 **Current Opinion in Rheumatology**, v. 23, n. 4, p. 327–333, 2011.  
14
- 15 ZOCHLING, J.; SMITH, E. U. R. Seronegative spondyloarthritis. **Best Practice and**  
16 **Research: Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 747–756, 2010.  
17  
18

1

**ANEXOS**

2

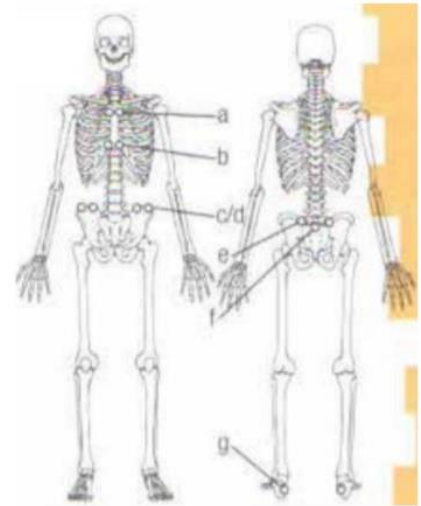
3

**ANEXO A**

4

**Escala de Maastricht para Enteses na Espondilite Anquilosante (MASES)****Escala de Maastricht para Enteses na Espondilite Anquilosante (MASES)****▪ 13 Locais:**

- Costocondral 1 direita/esquerda (a)
- Costocondral 7 direita/esquerda (b)
- Espinha ilíaca anterior superior direita/esquerda (c)
- Crista ilíaca direita/esquerda (d)
- Espinha ilíaca posterior direita/esquerda (e)
- Processo espinhoso em L5 (f)
- Tendão de Aquiles, inserção proximal direita/esquerda (g)

**▪ Sem Graduação****▪ Cada local recebe pontuação de 0 ou 1****▪ O índice MASES é dado pela soma das pontuações de todos os locais (0 a 13)**

5

6

7

1

## ANEXO B

2

**BATH ANKYLOSING SPONDYLITIS ACTIVITY INDEX - BASDAI (versão validada**

3

**para o Português)**

Coloque uma marca em cada linha abaixo, indicando sua resposta para cada questão relacionada à semana passada.

1. Como você descreveria o grau de fadiga ou cansaço que você tem tido?

0 \_\_\_\_\_ 10 cm  
Nenhum Intenso

2. Como você descreveria o grau total de dor no pescoço, nas costas e no quadril relacionada à sua doença?

0 \_\_\_\_\_ 10 cm  
Nenhum Intenso

3. Como você descreveria o grau total de dor e edema (inchaço) nas outras articulações sem contar com pescoço, costas e quadril?

0 \_\_\_\_\_ 10 cm

4. Como você descreveria o grau total de desconforto que você teve ao toque ou à compressão em regiões do corpo doloridas?

0 \_\_\_\_\_ 10 cm  
Nenhum Intenso

5. Como você descreveria a intensidade da rigidez matinal que você tem tido a partir da hora em que você acorda?

0 \_\_\_\_\_ 10 cm  
Nenhum Intenso

6. Quanto tempo dura a rigidez matinal a partir do momento em que você acorda?

0h \_\_\_\_\_ 30min \_\_\_\_\_ 1h \_\_\_\_\_ 1h 30min \_\_\_\_\_ 2h

4

**Cálculo do BASDAI (cm): ["1" + "2" + "3" + "4" + (média de "5" e "6")]/5**

5

6

## ANEXO C

1  
2

Fórmulas para cálculo do escore ASDAS por proteína C reativa (PCR) e por velocidade de hemossedimentação (VHS) em calculadora específica:

<b>ASDAS – PCR</b>	$0.12 \times \text{Dor axial} + 0.06 \times \text{Duração da rigidez matinal} + 0.11 \times \text{Avaliação Global do Paciente} + 0.07 \times \text{Dor/Edema periféricos} + 0.58 \times \text{Ln (PCR+1)}$
<b>ASDAS - VHS</b>	$0.08 \times \text{Dor axial} + 0.07 \times \text{Duração da rigidez matinal} + 0.11 \times \text{Avaliação Global do Paciente} + 0.09 \times \text{Dor/Edema periféricos} + 0.29 \times \sqrt{\text{VHS}}$

$\sqrt{\text{VHS}}$ , raiz quadrada da velocidade de hemossedimentação (mm/h); Ln (PCR+1), logaritmo natural da proteína C reativa (mg/L)+1.

Dor axial, avaliação global do paciente, duração da rigidez matinal e dor/edema periféricos são avaliados em escala analógica (de 0 a 10 cm) ou em uma escala numérica (de 0 a 10).

Dor axial (questão 2 do BASDAI): "Como você descreveria o grau total de dor no pescoço, nas costas e no quadril relacionada à sua doença?"

Duração da rigidez matinal (questão 6 do BASDAI): "Quanto tempo dura a rigidez matinal a partir do momento em que você acorda?"

Avaliação do paciente: "Quão ativa esteve a sua espondilite em média na última semana\*?"

Dor/edema periférico (questão 3 do BASDAI): "Como você descreveria o grau total de dor e edema (inchaço) nas outras articulações sem contar com pescoço, costas, região lombar e quadril?"

\*Tradução literal para o português validada pela Sociedade Brasileira de Reumatologia.

]

<b>Doença inativa</b>	< 1,3
<b>Atividade de doença moderada</b>	1,4 -2,0
<b>Atividade de doença alta</b>	2,1 – 3,5
<b>Atividade de doença muito alta</b>	>3,5

3  
4

## ANEXO D

TABELA 3  
*THE BATH ANKYLOSING SPONDYLITIS FUNCTIONAL INDEX (BASFI)*

Faça uma marca em cada linha abaixo de cada pergunta indicando o seu grau de capacidade para realizar as seguintes atividades durante a última semana:

1. Vestir meias ou meia-calça sem ajuda ou auxílio de aparelhos.
2. Curvar o corpo da cintura para cima para pegar uma caneta do chão sem o uso de um instrumento de auxílio.
3. Alcançar uma prateleira alta sem ajuda ou auxílio de um instrumento.
4. Levantar-se de uma cadeira sem braços da sala de jantar sem usar suas mãos ou qualquer outro tipo de ajuda.
5. Levantar-se quando deitado de costas no chão sem ajuda.
6. Ficar em pé sem ajuda por 10 minutos sem desconforto.
7. Subir 12 a 15 degraus sem usar o corrimão ou outra forma de apoio (andador). Um pé em cada degrau.
8. Olhar para trás, virando a cabeça sobre o seu ombro sem virar o corpo.
9. Fazer atividades que exijam esforço físico, isto é, fisioterapia, jardinagem ou esporte.
10. Ter um dia repleto de atividades, seja em casa ou no trabalho.

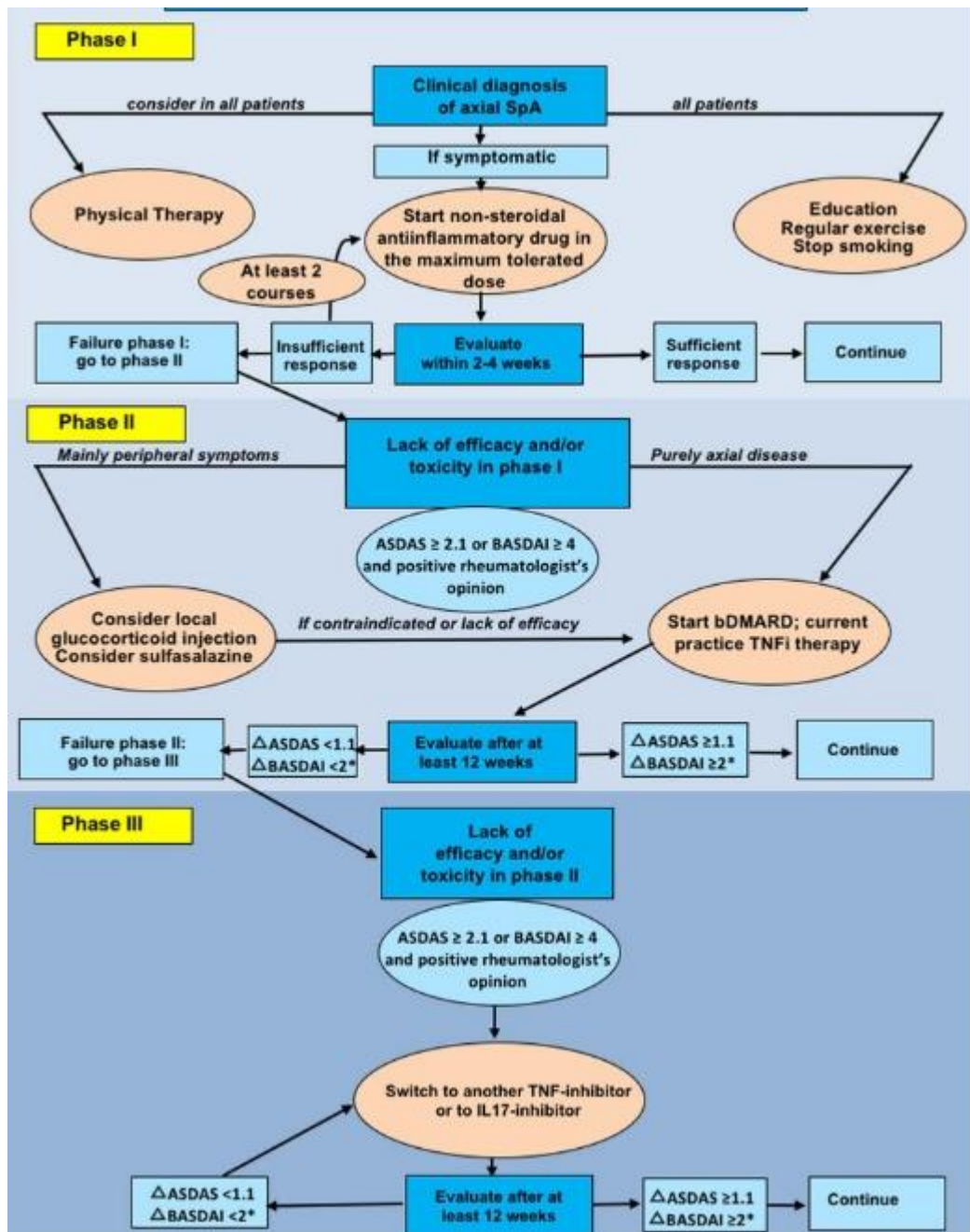
---

Fácil

Impossível

ANEXO E

Recomendação ASAS-EULAR 2016 para o manejo da espondiloartrite axial

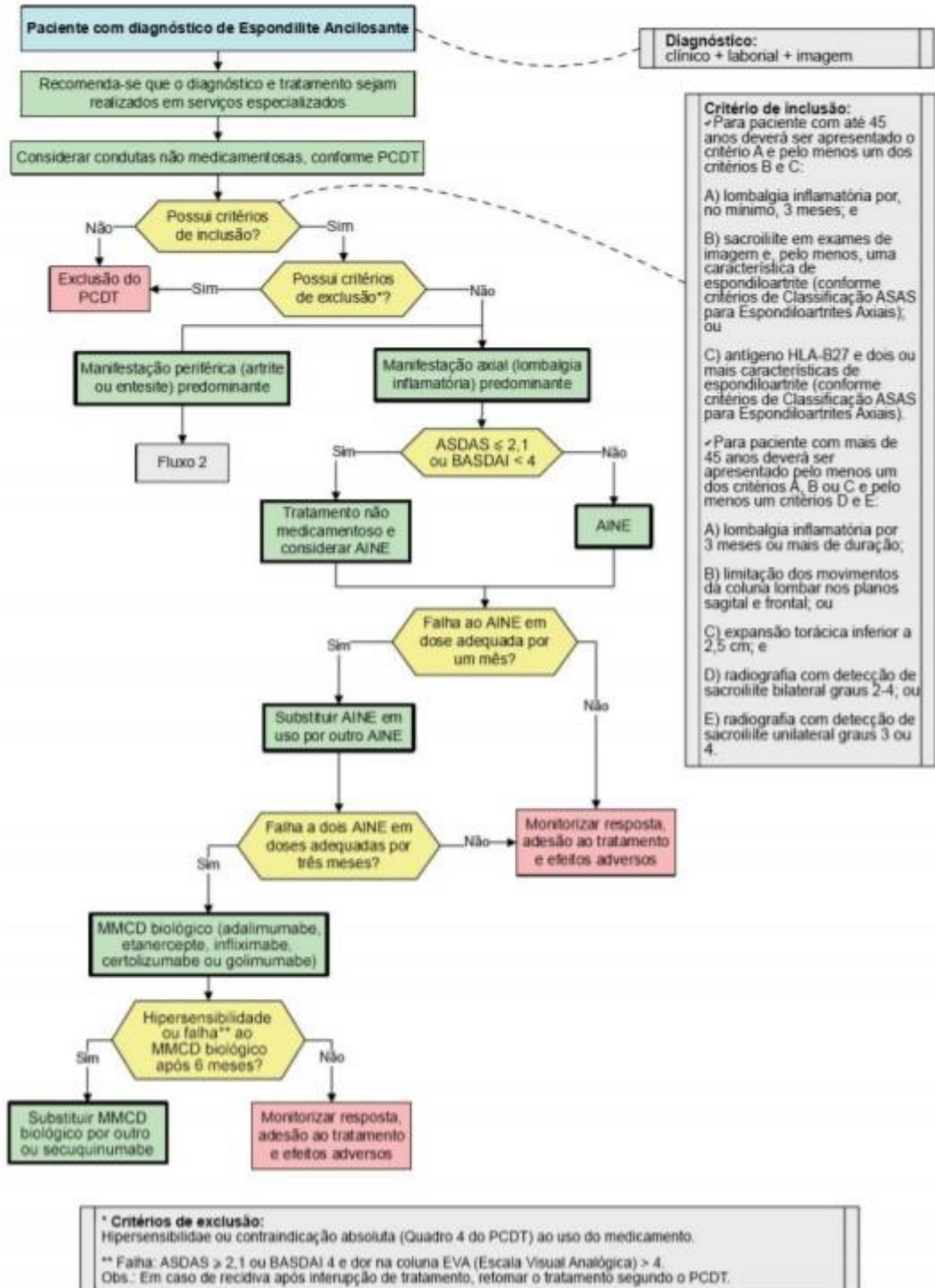


1  
2

3  
4  
5

ANEXO F

Fluxograma de tratamento da espondilite anquilosante: protocolo de diretrizes clínica e terapêuticas



1  
2  
3  
4  
5

6  
7

## ANEXO G

## Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
DIRETORIA SUPERINTENDENTE  
**PARECER Nº145**  
**PROCESSO 23892.2015.46**

À Pesquisadora  
Andrea Name Colado Simão

Considerando o Projeto de Pesquisa com o título "AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICO E ERITROCITÁRIO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ATIVIDADE DA DOENÇA, CAPACIDADE FUNCIONAL E MOBILIDADE DA COLUNA VERTEBRAL EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE", apresentado a esse Hospital Universitário, estando vinculado ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem Fundamental pela Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP;

Considerando o parecer favorável apresentado nas instâncias administrativas que envolvem a realização do estudo.

Informamos que o nosso **parecer é favorável** à realização do projeto acima nominado, resguardando-se o atendimento da legislação vigente.


Atendendo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde o projeto deverá ser analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL (CEP/UEL) para posterior operacionalização.

Conforme **Ofício Circular da Diretoria Superintendente do HU nº 214/2015**, a cópia do parecer de aprovação do CEP/UEL deverá ser apresentado à Chefia e/ou Gerente das unidades envolvidas antes do início da coleta de dados.

Solicitamos que, tão logo o Comitê de Ética emita parecer, essa Diretoria Superintendente seja notificada, para os procedimentos cabíveis relacionados à documentação da pesquisa.

Solicitamos também que, uma vez realizado o estudo, uma cópia seja apresentada a esta Diretoria, para ciência e divulgação.

Em 22/12/2016

  
Enfa. Dra. Elizabeth Silva Ursi  
Diretora Superintendente

Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa Científica (CAPEC) do HU  
Fone: (43)3371-2301  
e-mail: pesquisahu@uel.br

Campus Universitário - Rodovia Celso Garcia Cid (PR-449), Km 380-Fone: (43) 3371-4000 - FAX: Fax 328-4440 - Caixa Postal 6001 - CEP 84051-990 - www.uel.br  
Hospital Universitário-Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 60 - Operário - Fone: (43) 3371-2000 FAX: Fax 3357-7409-CEP 86056-410- www.hu.uel.br

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL



Form. Código 34057 - Formato A4 (210X297)

1  
2  
3  
4

5



## FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICO E ERITROCITÁRIO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ATIVIDADE DA DOENÇA, CAPACIDADE FUNCIONAL E MOBILIDADE DA COLUNA VERTEBRAL EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE.			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 100			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>			
5. Nome: Andréa Name Colado Simão			
6. CPF: 014.336.329-85	7. Endereço (Rua, n.º): Alameda Louvelras 715 Vivendas do Arvoredo casa X4 LONDRINA PARANA 86055784		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (43) 3371-2321	10. Outro Telefone:	11. Email: deianame@yahoo.com.br
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>09 / 05 / 2016</u>		 Assinatura <b>Andréa N. C. Simão</b> HU-LAC Encomenda do Setor de Imunologia Clínica CR7 11086 - CPF 014.336.329-85	
<b>INSTITUIÇÃO PROPONENTE</b>			
12. Nome: Universidade Estadual de Londrina - UEL	13. CNPJ:	14. Unidade/Orgão: CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias	
15. Telefone: (43) 3371-2200	16. Outro Telefone:		
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>Vera Lucia Hideto Tatakibara</u> CPF: <u>731.188.699-68</u>			
Cargo/Função: <u>vice-chefe de departamento</u>			
Data: <u>09 / 05 / 2016</u>		 Assinatura	
<b>PATROCINADOR PRINCIPAL</b>			
Não se aplica.		Vera Lucia Hideto Tatakibara Vice-Chefe do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias CCS / UEL	

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICO E ERITROCITÁRIO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ATIVIDADE DA DOENÇA, CAPACIDADE FUNCIONAL E MOBILIDADE DA COLUNA VERTEBRAL EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE”**, a ser realizada em **“Londrina”**. O objetivo da pesquisa é **“avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença”**. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: realização de uma avaliação clínica pelo médico urologista e uma coleta de sangue. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa.

Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Todos os dados coletados, clínicos e laboratoriais, serão descartados após a publicação do estudo. Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação. A sua participação neste estudo contribuirá para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da doença. Quanto aos riscos, informamos que sua participação não acarretará em qualquer risco à sua saúde nem alteração de qualquer um dos seus tratamentos.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos **contatar (Andréa Name Colado Simão, Avenida Robert Koch 60, telefone: 3371-2321)**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC –

1 Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail:  
2 [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

3 Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas  
4 devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

5

6

7

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

8

9

10 **Pesquisadores Responsáveis:**

11

12 **Profa Dra. Andréa Name Colado Simão**

13 RG: 6.226.736-4

14 Tel: 3371-2321 / 9627-8181

15

16

17

18

19 \_\_\_\_\_ (NOME POR EXTENSO DO SUJEITO  
20 DE PESQUISA), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da  
21 pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

22

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

24

Data: \_\_\_\_\_

25

26

27 Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e  
28 deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.

29

30

1 APÊNDICE B

2 FICHA DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES COM ESPODILORTRITES

3

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

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

6 IDADE ou Data de nascimento: \_\_\_\_\_

7 Sexo: ( ) feminino ( ) masculino

8 Etnia: ( ) caucasiano ( ) não caucasiano

9 Tabagismo : ( ) sim ( ) não

10

11 Atividade física: sim ( ) não ( )

12 Tipo: \_\_\_\_\_ frequência : \_\_\_\_\_

13

14 Dados antropométricos

15 Altura \_\_\_\_\_ (cm). Peso \_\_\_\_\_ (Kg). IMC (Kg/ m2) \_\_\_\_\_ Circ bdominal \_\_\_\_\_ (cm)

16

17 Pressão arterial: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ (mmHg)

18

19 DIAGNÓSTICO: ( ) EA ( ) APSO ( ) AE ( ) ARE ( ) OUTROS: \_\_\_\_\_

20 TEMPO DE DIAGNÓSTICO (ANOS): \_\_\_\_\_

21 HLA - B27: ( ) Negativo ( ) Positivo

22

23 Comprometimento sistêmico extra-articular:

24 Pulmonar ( ) ocular ( ) intestinal ( ) cardíaco ( )

25 Outras doenças:

26 HAS ( ) DM ( ) dislipidemia ( ) IAM ( ) AVC ( ) tireoidopatia ( ),

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

28 **MEDICAÇÕES**

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

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

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

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

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

34 ( ) AINE : \_\_\_\_\_ dose: \_\_\_\_\_ sob demanda sim( ) não ( )

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

36 Quantas articulações edemaciadas: \_\_\_\_\_

37 Quantas entesites: \_\_\_\_\_ escala de MASES: \_\_\_\_\_

38 BASDAI: \_\_\_\_\_ BASFI: \_\_\_\_\_

39 Schober: \_\_\_\_\_ cm