



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANA MAYUMI VEIGA IRIYODA

**ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES *TGFB1*
(rs1800470 e rs1800469) E *IL10* (rs1800782) COM
PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Londrina
2020

TATIANA MAYUMI VEIGA IRIYODA

**ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES *TGFB1*
(rs1800470 e rs1800469) E *IL10* (rs1800782) COM
PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina
2020

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

IRIYODA, TATIANA MAYUMI VEIGA.

ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES TGFB1 (rs1800470 e rs1800469) E IL10 (rs1800782) COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE. / TATIANA MAYUMI VEIGA IRIYODA. - Londrina, 2020.
112 f. : il.

Orientador: ANDRÉA NAME COLADO SIMÃO.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Artrite reumatoide - Tese. 2. Variante genética - Tese. 3. Fator de Crescimento Transformador beta 1 - Tese. 4. Interleucina-10 - Tese. I. SIMÃO, ANDRÉA NAME COLADO. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 61

TATIANA MAYUMI VEIGA IRIYODA

ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES *TGFB1* (rs1800470 e rs1800469) E *IL10* (rs1800782) COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado
Simão
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Neide Tomimura Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Regina Célia Poli
Pontifícia Universidade Católica - PUC/PR

Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 21 de outubro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por permitir e abençoar a realização de trabalho.

À minha família e, em especial ao meu esposo, por ter me dado um grande apoio, especialmente no cuidado da nossa pequena Julia, para que eu pudesse me dedicar à conclusão desse trabalho.

À minha orientadora, Prof. Dra. Andréa Name Colado Simão, que possibilitou o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, por me incentivar desde a residência médica a crescer profissionalmente, a quem sou grata e tenho uma imensa admiração pela sua garra e determinação, pela maestria e dedicação em nos ensinar e pela compreensão nos momentos mais delicados da nossa vida pessoal.

À Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, a quem tenho profundo respeito e admiração por toda sua trajetória de trabalho e exemplo de vida, que despertou em mim desde lá na graduação a paixão pela imunologia e o encanto pela sua maneira de ensinar.

À Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira, a quem admiro muito pela sua integridade, inteligência e trajetória de trabalho, além das contribuições nesse trabalho.

À Profa. Dra. Tamires Flauzino, pela valiosa ajuda, apoio e incentivo desde as coletas, passando pela realização dos exames, banco de dados, estatística e orientações para os artigos e a tese.

Às amigas reumatos Cecília, Meline e Bianca, que concederam o espaço da clínica para que eu pudesse me concentrar fora de casa em plena pandemia e assim finalizar esse trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Imunologia Aplicada que muito contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste projeto.

Aos professores doutores da Pós-graduação, que se empenham em produzir trabalhos de alta qualidade e elevam o conceito desta instituição.

IRIYODA, Tatiana Mayumi Veiga. **Associação das variantes dos genes *TGFB1* (rs1800470 e rs1800469) e *IL10* (rs1800782) com parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes com artrite reumatoide**. 2020. 112 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Introdução: Na artrite reumatoide (AR) existe um desequilíbrio entre vias inflamatórias e regulatórias, com predomínio das respostas imunes mediadas por células Th1 e Th17 em detrimento das respostas imunes mediadas pelas células Th2 e T reguladoras. Diferentes variantes genéticas podem afetar os níveis de expressão das citocinas e, dessa forma, desempenhar um papel na suscetibilidade e no curso da doença. **Objetivo:** Avaliar a associação entre as variantes +869 T>C (rs1800470) e -509 C>T (rs1800469) do *TGFB1* e -592 C>A (rs1800782) do *IL10* com suscetibilidade à AR, atividade da doença, presença de autoanticorpos e níveis plasmáticos de citocinas. **Metodologia:** O estudo incluiu 262 pacientes com AR e 168 indivíduos saudáveis (grupo controle), de ambos os sexos, com idade entre 18 a 70 anos. A atividade da doença foi determinada pelo escore DAS28 e os pacientes classificados em dois diferentes grupos: remissão/leve (DAS28<3,2) e moderada/grave (DAS28≥3,2). Foram determinados os autoanticorpos Fator Reumatoide (FR) e anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), a interleucina (IL)-10 e o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-β1). A variante -592 C>A do *IL10* foi genotipada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). As variantes +869 T>C e -509 C>T do *TGFB1* foram avaliadas por PCR em tempo real (qPCR) pelo método de TaqMan®. Os valores de p foram ajustados para variáveis confundidoras como idade, sexo, etnia, índice de massa corporal, tabagismo e medicamentos utilizados no tratamento da AR. **Resultados:** As variantes +869 T>C e -509 C>T do *TGFB1*, independentemente ou em combinação haplotípica, não foram associadas com a suscetibilidade à AR. Pacientes com o genótipo TT da variante -509 C>T do *TGFB1* apresentaram maior chance de apresentar DAS28≥3,2 (OR 2,58, 95% CI 1,04–6,42, p=0,041) do que os portadores dos demais genótipos. Não foi observada associação entre as variantes genéticas e os níveis plasmáticos de TGF-β1 no grupo AR como um todo; porém, a presença do genótipo CC da variante +869 T>C do *TGFB1* no subgrupo de pacientes com FR ou anti-CCP positivo foi associada com baixos níveis de TGF-β1 (p=0,032 e p=0,039, respectivamente). Pacientes com elevados títulos de FR (>90 U/mL) e presença do alelo C da variante +869 T>C do *TGFB1* demonstraram maior frequência de DAS28≥3,2 (p=0,037). Quanto à variante -592 C>A do *IL10*, não foi observada associação com suscetibilidade à AR, DAS28 e níveis plasmáticos de IL-10. No entanto, pacientes com o genótipo AA da variante -592 C>A do *IL10* apresentaram maior chance de apresentar FR positivo (OR 2,78, 95% CI 1,15–6,67, p=0,022). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que as variantes *TGFB1* +869 T>C e *TGFB1* -509 C>T podem prever a atividade de doença em diferentes subgrupos de pacientes com AR, de acordo com a positividade do FR. A variante *IL10* -592 C>A foi associada à presença de FR, independentemente da atividade da doença e outros fatores confundidores e, portanto, pode ajudar na identificação precoce de pacientes com um curso de doença mais grave e que podem se beneficiar de uma abordagem terapêutica individualizada.

Palavras-chave: Artrite reumatoide. Fator reumatoide. DAS28. Variante genética. Interleucina-10. Fator de Crescimento Transformador beta 1.

IRIYODA, Tatiana Mayumi Veiga. **Association of *TGFB1* (rs1800470 e rs1800469) and *IL10* (rs1800782) variants with clinical and laboratory parameters in rheumatoid arthritis patients.** 2020. 112 p. Thesis (Doctorate's degree in Experimental Pathology - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Introduction: In rheumatoid arthritis (RA), there is an imbalance between inflammatory and regulatory pathways, with a predominance of Th1 and Th17 mediated responses to the detriment of the Th2 and regulatory T cells mediated responses. Different genetic variants can affect cytokine levels and thus play a role in the susceptibility and course of the disease. **Objective:** To evaluate the association between *TGFB1* +869 T>C (rs1800470), *TGFB1* -509 C>T (1800469), and *IL10* -592 C>A (rs1800782), variants with RA's susceptibility, disease activity, presence of autoantibodies and cytokine plasma levels. **Methodology:** The study included 262 RA patients and 168 healthy blood donors (control group), of both sexes, between 18 and 70 years old. The disease activity was determined with the DAS28 score, and patients were classified into two groups: remission/mild (DAS28 <3.2) and moderate/severe (DAS28 ≥3.2). Rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies, interleukin (IL) -10, and transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) were determined. The *IL10* -592 A>C variant was genotyped by the polymerase chain reaction (PCR) and the restriction fragment length polymorphism (RFLP). *TGFB1* +869 T>C and *TGFB1* -509 C>T variants were evaluated by real time PCR (qPCR) using the TaqMan® method. The p values were adjusted for confounding variables such as age, sex, ethnicity, body mass index, smoking, and medications used to treat RA. **Results:** The *TGFB1* +869 T>C and *TGFB1* -509 C>T variants, independently or in haplotype combination, were not associated with RA's susceptibility. Patients with the *TGFB1* -509 TT genotype had a highest chance of DAS28 ≥3.2 (OR 2.58, 95% CI 1.04–6.42, p=0.041) than those with other genotypes. Although the genetic variants were not associated with TGF-β1 plasma levels in the overall group of RA patients, the presence of the *TGFB1* +869 CC genotype in the subgroup of seropositive patients for RF or anti-CCP was associated with decreased TGF-β1 levels (p=0.032 and p=0.039, respectively). Besides, patients with the *TGFB1* +869 C allele and elevated RF titles demonstrated a high frequency of DAS28 ≥3.2 (p=0.037). The *IL10* -592 C>A variant was not associated with RA's susceptibility, disease activity, and IL-10 plasma levels. However, patients with *IL10* -592 AA genotype had a highest chance of positive RF (OR 2.78, 95% CI 1.15–6.67, p=0.022). **Conclusion:** Our findings suggest that *TGFB1* +869 T>C and -509 C>T variants can predict disease activity in different RA patient subgroups, according to the RF's positivity. The *IL10* -592 C>A variant was associated with the presence of RF, independently of disease activity and other confounding factors, and thus, may help to identify earlier those patients with a more severe disease course that will benefit from an individualized therapeutic approach.

Keywords: Arthritis, Rheumatoid. Rheumatoid Factor. DAS28. Polymorphism, Genetic. Interleukin-10. Transforming Growth Factor beta1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fatores envolvidos no desencadeamento da artrite reumatoide	20
Figura 2	Células e citocinas envolvidas no desencadeamento e fisiopatologia da artrite reumatoide.	22
Figura 3	Ação do fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1) na artrite reumatoide	25
Figura 4	Ação da interleucina-10 (IL-10) na artrite reumatoide	26
Figura 5	Estrutura do gene TGFB1 e localização das variantes -509 C> (rs1800469) e +869 T>C (rs1800470).....	28
Figura 6	Estrutura do gene IL10 e localização da variante -592 C>A (rs1800872).....	32
Figura 7	Visão geral sobre os medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD)	37
Figura 8	Algoritmo de decisão terapêutica da artrite reumatoide	40
Figura 9	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, para caracterização dos genótipos da variante -592 C>A do gene IL10	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios de 2010 do ACR/EULAR para classificação de artrite reumatoide	15
Tabela 2	Classificação da atividade da doença de acordo com os critérios propostos pelo <i>Disease Activity Score 28</i> (DAS28)	16
Tabela 3	Variantes genéticas não-HLA associadas com suscetibilidade à AR	18
Tabela 4	Variante genética +869 T>C (rs1800470) do gene <i>TGFB1</i> avaliada em pacientes com artrite reumatoide.....	30
Tabela 5	Variante -592 C>A (rs1800872) do gene <i>IL10</i> avaliada em pacientes com artrite reumatoide	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ACPA	Anticorpos anti-proteínas citrulinadas
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AR	Artrite reumatoide
Anti-CCP	Anticorpos contra peptídeos citrulinados cíclicos
CI	Cardiopatia isquêmica
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DAS28	<i>Disease Activity Score 28</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESM	Escore Sharp modificado
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FR	Fator reumatoide
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago
HCQ	Hidroxicloroquina
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN- γ	Interferon gama
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
JAK	Janus quinase
LEF	Leflunomida
MMCD	Medicamentos modificadores do curso da doença
MMCDbio	Medicamentos modificadores do curso da doença biológicos
MMCDs	Medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTX	Metotrexato
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NK	<i>Natural killer</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PADI4	Enzima peptidilarginina deiminase tipo IV
PCDT	Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas
PCR	Proteína C reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22</i>
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear kappa-B
SNVs	Variantes de nucleotídeos únicos
SSZ	Sulfassalazina
Th	<i>T helper</i>
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
Treg	Linfócito T regulador
<i>TGFB1</i>	Gene do Fator de crescimento transformador beta 1
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE	16
1.1.1	Imunopatogênese da Artrite Reumatoide	19
1.1.1.1	Papel das células T reguladoras na artrite reumatoide	23
1.2	VARIANTES GENÉTICAS -509 C>T (RS1800469) E +869 T>C (RS1800470) DO TGFB1	27
1.3	VARIANTE GENÉTICA -592 C>A (RS1800872) DO GENE IL10	32
1.4	TRATAMENTO MEDICAMENTOSO	36
2	JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	METODOLOGIA	43
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	43
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM	43
4.3	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	44
4.4	MARCADORES IMUNOLÓGICOS	44
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA	44
4.6	VARIANTES -509 C>T (Rs1800469) E +869 T>C (Rs1800470) DO GENE TGFB1	45
4.7	VARIANTE -592 C>A (Rs1800872) DO GENE IL10	45
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	RESULTADOS	48
5.1	ARTIGO 1	49
5.2	ARTIGO 2	74
6	CONCLUSÃO	92

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
	REFERÊNCIAS.....	94
	APÊNDICE	107
	APÊNDICE A termo de consentimento livre e esclarecido	107
	APÊNDICE B ficha de avaliação das28.....	109
	APÊNDICE C ficha de avaliação dos pacientes com artrite reumatoide	110
	ANEXO.....	111
	ANEXO A parecer do comitê de ética em pesquisa da universidade estadual de londrina.....	111

1 1 INTRODUÇÃO

2 A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica
3 caracterizada por poliartrite inflamatória que afeta, preferencialmente, pequenas
4 articulações e leva à destruição articular. Além das articulações, a AR pode acometer
5 outros órgãos e reduzir a expectativa de vida, sendo o aumento de mortalidade
6 consequente a doenças cardiovasculares, infecções e neoplasias (RUPP et al., 2004).

7 De acordo com o *The Global Burden of Disease 2010 Study*, a
8 prevalência mundial da AR é estimada em 0,24% (CROSS et al., 2014), sendo mais
9 frequente em mulheres e na faixa etária de 30 a 50 anos (ALAMANOS, DROSOS,
10 2005). A maioria dos estudos epidemiológicos conduzidos nos Estados Unidos e no
11 norte Europeu apresentam estimativas de prevalência da AR um pouco maior, entre
12 0,5 a 1% (HUNTER et al., 2017; MYASOEDOVA et al., 2010) e uma incidência anual
13 de AR de aproximadamente 40 por 100.000 pessoas (ERIKSSON et al., 2013;
14 MYASOEDOVA et al., 2010).

15 O diagnóstico de AR é realizado com base em achados clínicos e
16 exames complementares. Clinicamente, identificam-se poliartrite simétrica aditiva,
17 artralgia e rigidez matinal prolongada, especialmente em pequenas articulações de
18 mãos e pés. Em fases tardias, surgem deformidades clássicas, como desvio ulnar dos
19 dedos, deformidades em “pescoço de cisne”, deformidades em “botoeira”, “mãos em
20 dorso de camelo”, tornozelos valgos e pés planos, além de diversas deformidades nos
21 dedos dos pés. Algumas manifestações extra-articulares, especialmente vasculite,
22 pericardite, pleurite e amiloidose se correlacionam com menor expectativa de vida
23 (MOURA et al., 2012).

24 Na avaliação laboratorial podemos encontrar anemia de doença crônica,
25 leucocitose, plaquetose, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e aumento de
26 atividade inflamatória, avaliada pela dosagem de proteína C reativa (PCR) e
27 velocidade de hemossedimentação (VHS). A detecção e titulação de autoanticorpos
28 como fator reumatoide (FR) (sensibilidade de 75% e especificidade de 85%) e
29 anticorpos contra peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) (sensibilidade de 75% e
30 especificidade de 95%) têm importância diagnóstica e prognóstica (MOTA et al.,

1 2013). Alguns aspectos clínicos e laboratoriais da AR estão relacionados à progressão
2 mais rápida da destruição articular e são reconhecidos como fatores de pior
3 prognóstico como sexo feminino, tabagismo, baixo nível sócio-econômico, início da
4 doença em idade mais precoce, FR ou anti-CCP em títulos elevados, níveis
5 persistentemente elevados de PCR ou do VHS, grande número de articulações
6 edemaciadas, manifestações extra-articulares e presença precoce de erosões na
7 evolução da doença (SAAG et al., 2008).

8 Os critérios de classificação como o *American College of Rheumatology*
9 (ACR) de 1987 e o *ACR/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR)* de
10 2010 auxiliam o diagnóstico de AR. Segundo o critério do ACR de 1987, a presença
11 de 4 ou mais dos seguintes critérios por um período maior ou igual a 6 semanas é
12 sugestivo de AR: 1) rigidez matinal, 2) artrite de três ou mais áreas articulares, 3)
13 artrite de mãos, 4) artrites simétricas, 5) nódulos reumatóides, 6) fator reumatóide
14 positivo e 7) alterações radiográficas (ARNETT et al., 1988). Contudo, os critérios de
15 1987 não se aplicavam a pacientes nas fases iniciais da doença, o que retardava o
16 início de tratamento em momento mais oportuno. Dessa forma, em 2010, foram
17 publicados os critérios do ACR/EULAR de 2010 (Tabela 1) que se baseiam em um
18 sistema de pontuação, levando-se em consideração o acometimento articular, os
19 autoanticorpos fator reumatóide e anti-CCP, provas de atividade inflamatória e
20 duração dos sintomas. Uma pontuação maior ou igual a 6 classifica um paciente como
21 tendo AR (ALETAHA et al., 2010). Em comparação com os critérios do ACR de 1987,
22 essa classificação aumenta a sensibilidade do diagnóstico e permite identificar os
23 casos mais precocemente.

24

25

26

27

1 **Tabela 1 – Critérios de 2010 do ACR/EULAR para classificação de artrite reumatoide.**

Grupo	Pontuação
Acometimento articular¹	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	2
4-10 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	3
> 10 articulações (pelo menos uma pequena articulação)	5
Sorologia²	
FR negativo ou anti-CCP negativo	0
FR positivo em título baixo ou anti-CCP positivo em título baixo	2
FR positivo em título alto ou anti-CCP positivo em título alto	3
Provas de fase aguda (pelo menos um resultado é necessário)³	
PCR e VHS normal	0
PCR ou VHS alterado	1
Duração dos sintomas⁴	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

2
3 Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como
4 artrite reumatoide.

5 ¹ Acometimento articular refere-se a qualquer articulação dolorosa ou inchada (excluindo
6 interfalangeanas distais do pé ou da mão, primeira metatarsfalangeana e primeira
7 carpometacarpeana). Evidência adicional obtida por exames de imagem pode ser utilizada
8 para confirmação dos achados clínicos. Consideram-se, para fins de classificação, como
9 pequenas articulações as metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais,
10 metatarsfalangeanas (segunda a quinta), primeira interfalangeanas dos polegares e punhos,
11 e como grandes articulações ombros, cotovelos, quadril, joelhos e tornozelos. Articulações
12 adicionais (temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, entre outras) podem ser
13 contadas na avaliação de “mais de 10 articulações”, desde que uma pequena articulação (ao
14 menos) esteja acometida.

15 ² Considera-se o resultado de FR e anti-CCP negativo se o valor encontrado for igual ou menor
16 ao limite superior da normalidade para o respectivo laboratório; positivo baixo se o valor
17 encontrado for maior que o limite superior da normalidade, mas menor ou igual a três vezes o
18 limite superior da normalidade; e positivo alto quando o valor encontrado for superior a três
19 vezes o limite superior da normalidade.

20 ³ As provas de atividade inflamatória (VHS e PCR) são consideradas normais ou alteradas de
21 acordo com o valor de referência do laboratório utilizado.

22 ⁴ Duração dos sintomas se refere ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos
23 sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da
24 avaliação.

1 FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpos contra peptídeos citrulinados cíclicos; VHS:
2 velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C reativa.

3 **Fonte:** adaptado de Aletaha et al., 2010.

4

5 A avaliação da atividade da doença é fundamental, uma vez que auxilia
6 na definição da conduta terapêutica. Utilizando-se de alguns parâmetros, foram
7 criados e validados índices compostos da atividade de doença como o *Disease Activity*
8 *Score 28* (DAS28). O DAS28 é calculado a partir de quatro variáveis: (1) número de
9 articulações dolorosas; (2) número de articulações edemaciadas; (3) VHS em mm/h
10 ou PCR em mg/L e (4) avaliação global de saúde segundo o paciente (ANDERSON
11 et al., 2012; WELLS et al., 2009). Pode ser facilmente calculado com auxílio de
12 calculadoras disponíveis na internet (www.das28.nl) ou aplicativos de celular. Os
13 pontos de corte para a definição da atividade de doença pelo DAS28 estão
14 apresentados na Tabela 2. A atividade é classificada em quatro níveis: alta, moderada,
15 mínima/baixa e em remissão (ANDERSON et al., 2012).

Tabela 2 – Classificação da atividade da artrite reumatóide de acordo com os critérios propostos pelo *Disease Activity Score 28* (DAS28).

Estado de atividade	DAS28
Remissão	<2,6
Mínima/Baixa	2,6 a <3.2
Moderada	3,2 a ≤5,1
Grave/Alta	>5,1

16 **Fonte:** Anderson et al., 2012.

17 1.1 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE

18 A AR é uma doença de etiologia multifatorial, com a participação de
19 fatores genéticos e ambientais. A história familiar de AR em parente de 1º grau
20 aumenta em cerca de duas vezes a chance de desenvolver a doença (JIANG et al.,
21 2015). A concordância entre gêmeos monozigóticos é de 15 a 30%, e em dizigóticos,
22 de 5% (MACGREGOR et al., 2000).

1 A contribuição genética para o desenvolvimento da AR gira em torno de
2 50-60% (VERHEUL et al., 2015). O principal predisponente genético é o antígeno
3 leucocitário humano (HLA), responsável por 30-50% da suscetibilidade genética geral
4 para a AR, particularmente o HLA-DRB1 (IMBODEN et al., 2009). Seus alelos
5 codificam proteínas com uma sequência de aminoácidos na região 70-74, chamada
6 epítipo compartilhado, identificada como um fator de risco para AR, além de ser um
7 marcador de pacientes com doença de evolução mais grave (GREGERSEN, SILVER,
8 WINCHESTER, 1987). Variantes de nucleotídeos únicos (SNVs) não relacionados ao
9 sistema HLA, em genes das respostas imunes inata e adaptativa também contribuem
10 para a suscetibilidade à AR. A segunda associação mais forte com AR envolve o gene
11 que codifica uma tirosina fosfatase intracelular, a PTPN22 (do inglês, *protein tyrosine*
12 *phosphatase non-receptor type 22*), relacionada com a inibição da ativação das
13 células T. A variante +1858 C>T (rs2476601) do gene *PTPN22*, localizada na posição
14 620 do cromossomo 1p13, resulta na substituição do aminoácido arginina por
15 triptofano da proteína. Portadores do alelo T apresentam uma super ativação das
16 células T após estimulação imune. Essa variante foi associada com FR e anti-CCP
17 (BOWES, BARTON, 2008; KORCZOWSKA, 2014). Outra associação com AR é
18 descrita com o gene *PADI4*, que codifica uma enzima que converte a arginina em
19 citrulina, processo chamado citrulinização, que leva à formação dos anticorpos anti-
20 proteínas citrulinadas (ACPA) (KORCZOWSKA, 2014; OKADA et al., 2014). Outros
21 genes de maior relevância associados com suscetibilidade à AR encontram-se na
22 tabela 3.

23

24

25

26

27

28

29

1 **Tabela 3** – Variantes genéticas não-HLA associadas com suscetibilidade à artrite
 2 reumatoide.

Variante genética	Locus	SNV	OR
PTPN22	1	rs2476601	1,81 (1,73-1,9)
PADI4	1	rs23021888	1,11 (1,06-1,15)
STAT4	2	rs11889341	1,13 (1,09- 1,17)
CTLA-4	2	rs3087243	1,15 (1,11-1.19)
CCR6	6	rs1571878	1,12 (1,1-1,16)
CCL21	9	rs11574914	1,13 (1,09-1,16)
TRAF1	9	rs10985070	1,09 (1,05-1,12)
CD40	20	rs4239702	1,15 (1,1-1,18)

3

4 HLA: antígeno leucocitário humano; SNV: variante de nucleotídeo único; OR: *odds ratio*;
 5 PTPN22: *protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 22*; PADI4: *peptidylarginine*
 6 *deiminase type IV*; STAT4: *signal transducer and activator of transcription 4*; CTLA-4: *cytotoxic*
 7 *T lymphocyte-associated antigen 4*; CCR6: *chemokine receptor 6*; CCL21: *chemokine ligand*
 8 *21*; TRAF1: *tumor necrosis factor receptor associated factor 1*; CD40: *cluster of differentiation*
 9 *40*.

10 **Fonte:** adaptado de Knevel, Huizinga, Kurreeman, 2017.

11

12 Dentre os fatores ambientais, tem-se atribuído que o tabagismo, a
 13 obesidade, a microbiota e as infecções podem induzir o desenvolvimento de AR em
 14 indivíduos geneticamente predispostos (CROIA et al., 2019). O tabagismo é
 15 considerado o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da AR,
 16 particularmente nos pacientes portadores do epítipo compartilhado HLA-DRB1
 17 (SUGIYAMA et al., 2010). O mecanismo pelo qual o tabagismo favorece o
 18 aparecimento da AR não está completamente elucidado; entretanto, parece envolver
 19 a indução da citrulinização de peptídeos e formação de radicais livres que favorecem
 20 ativações genéticas e formação de autoanticorpos anti-CCP (GOELDNER et al.,
 21 2011). De maneira semelhante, a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, frequentemente
 22 encontrada na periodontite e, em maior prevalência em pacientes com AR, também
 23 induz a citrulinização e perda da tolerância imunológica a peptídeos citrulinados
 24 (CECCARELLI et al., 2018). Infecções virais pelo Epstein-Barr, citomegalovírus e de
 25 bactérias como *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* parecem induzir, por mimetismo
 26 celular, processo inflamatório com formação de imunocomplexos e autoanticorpos

1 contra a porção Fc das imunoglobulinas, designados de FR (MCINNES, SCHETT,
2 2011; MUNIZ PEDROGO et al., 2018). Também foi demonstrada associação entre AR
3 e obesidade (DAR et al., 2018) e uma metanálise baseada em mais de 350.000
4 pacientes mostrou que um maior índice de massa corporal (IMC) aumenta o risco de
5 AR em comparação àqueles com o peso normal, principalmente na população
6 feminina (ZHOU, SUN, 2018).

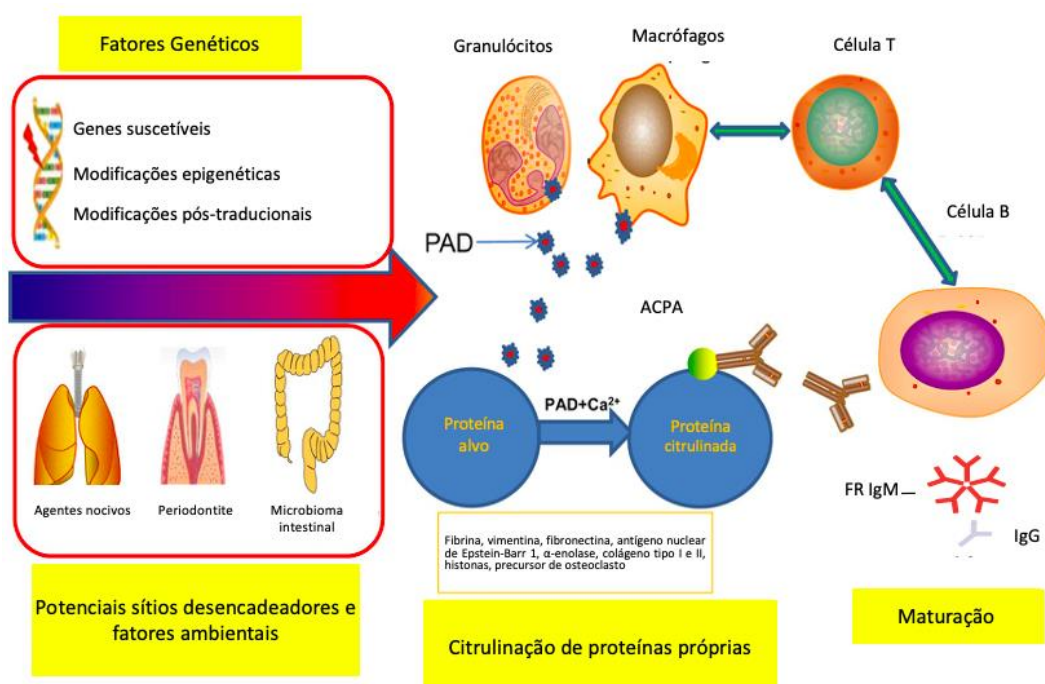
7 1.1.1 Imunopatogênese da Artrite Reumatoide

8 A ação lesiva do tabagismo e de agentes infecciosos, especialmente nas
9 mucosas do trato gastrointestinal e nos brônquios, seriam responsáveis pelo evento
10 denominado citrulinização (figura 1), que é a alteração de peptídeos próprios com a
11 transformação de resíduos de arginina em citrulina pela enzima peptidilarginina
12 deiminase tipo IV. Várias são as autoproteínas citrulinadas, dentre elas a α -enolase,
13 a queratina, o fibrinogênio, a fibronectina, o colágeno e a vimentina. Esse “novo”
14 aminoácido comporta-se como um neoepítipo, por não ter sido encontrado pelo timo
15 durante o desenvolvimento inicial. Esses peptídeos citrulinados são apresentados aos
16 linfócitos T CD4⁺, levando à sua ativação e migração para órgãos linfóides
17 secundários (GUO et al., 2018).

18 O papel dos linfócitos B na patogênese da AR inclui a apresentação de
19 antígenos, a produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa
20 (TNF- α) e a interleucina (IL)-6 (PAULA, ALVES, 2014), além da produção de
21 autoanticorpos. A ativação dos linfócitos B pelos linfócitos T CD4⁺ desencadeia a
22 formação de autoanticorpos do tipo FR e anti-CCP (DE RYCKE et al., 2004; VAN DER
23 WOUDE et al., 2010). Esses anticorpos podem estar presentes por anos antes do
24 início dos sintomas da AR, caracterizando a chamada fase pré-clínica da AR
25 (INGEGNOLI, CASTELLI, GUALTIEROTTI, 2013; SOKOLOVE et al., 2012). A
26 presença de FR e anti-CCP se correlaciona com gravidade da doença e doença
27 erosiva com maior risco de progressão radiográfica (MALMSTROM, CATRINA,
28 KLARESKOG, 2017). Esses autoanticorpos contribuem para a patogênese da AR pela
29 formação de imunocomplexos e ativação do sistema complemento e,
30 conseqüentemente, de mediadores inflamatórios (TAN, SMOLEN, 2016). Há
31 evidência *in vitro* que o FR promova a produção de citocinas inflamatórias por meio

1 da interação com imunocomplexos formados com ACPA em pacientes com AR
 2 (SOKOLOVE et al., 2014). Estudos demonstraram associação entre a presença de
 3 ACPA e o risco de desenvolvimento de erosões ósseas (DE RYCKE et al., 2004;
 4 RÖNNELID et al., 2005). Complexos imunes contendo ACPA podem promover a
 5 ativação de macrófagos, os quais secretam citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α
 6 e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK-L) que estimulam a
 7 diferenciação de osteoclastos (HOLERS, BANDA, 2018; SMOLEN, ALETAHA,
 8 MCINNES, 2016). O reconhecimento direto de proteínas citrulinadas na superfície de
 9 precursores de osteoclastos também pode resultar na geração de osteoclastos
 10 (COUTANT, 2019).

11 **Figura 1 – Fatores envolvidos no desencadeamento da artrite reumatoide.**



12

13 A AR pode ser desencadeada em sítios potenciais (pulmões, cavidade oral, intestino) pela
 14 interação entre fatores genéticos e ambientais. A exposição pulmonar a agentes nocivos,
 15 agentes infecciosos (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e
 16 vírus Epstein-Barr), o microbioma intestinal e fatores dietéticos podem induzir a citrulinização
 17 de proteínas próprias e maturação de ACPA. Esse processo é catalisado pela enzima PAD,
 18 dependente de cálcio, secretada por granulócitos e macrófagos, promovendo a troca de uma
 19 arginina para citrulina. ACPA ocorrem como resultado de uma resposta anormal de anticorpos
 20 a uma gama de proteínas citrulinadas, que incluem fibrina, vimentina, fibronectina, α -enolase,
 21 colágeno tipo II e histonas, amplamente distribuídas por todo o corpo. Esses neoantígenos
 22 citrulinados ativam então linfócitos T que, por sua vez ativam linfócitos B a produzir mais

1 ACPA. AR: artrite reumatoide, PAD: peptidilarginina deiminase, ACPA: anticorpos anti-
2 proteína citrulinada, FR: fator reumatoide.

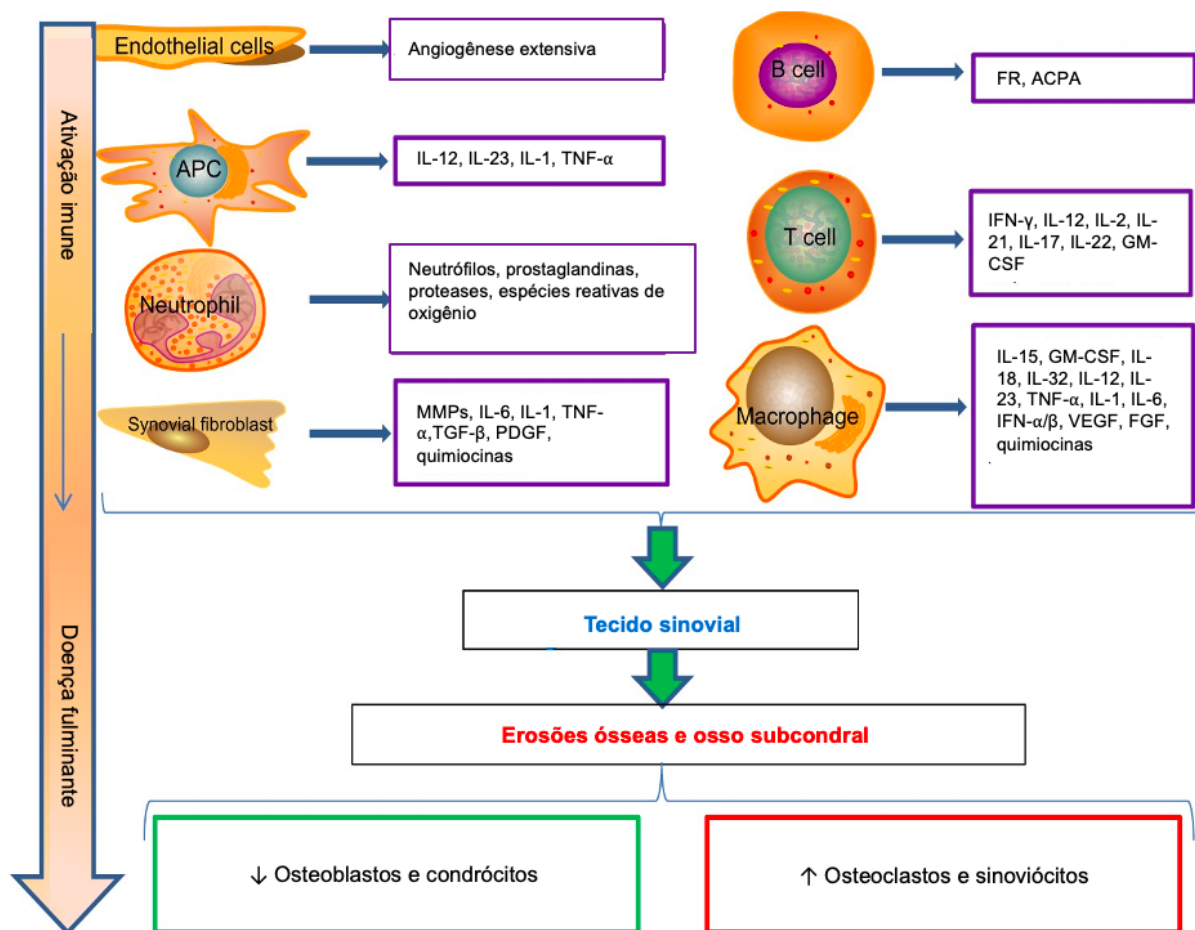
3 **Fonte:** Adaptado de Guo et al., 2018

4

5 A neoangiogênese, induzida por hipóxia local e citocinas inflamatórias, e
6 a ativação endotelial de vasos da membrana sinovial, levam ao aumento da expressão
7 de moléculas de adesão e quimiocinas. O compartimento sinovial é então infiltrado
8 por células (figura 2) que compõe a resposta imune inata (monócitos, células
9 dendríticas, mastócitos, neutrófilos e células linfóides inatas) e células da resposta
10 imune adaptativa [células T *helper* (Th) 1, Th17, células B e plasmócitos] (GUO et al.,
11 2018). Monócitos migram para a sinóvia e se diferenciam em macrófagos pró-
12 inflamatórios que produzem diversas citocinas, tais como o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12,
13 IL-15, IL-18 e IL-23, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs),
14 prostanoídes e enzimas que degradam matriz extracelular, além de realizarem
15 fagocitose e apresentação de antígenos (MCINNES, SCHETT, 2011). Os neutrófilos
16 são abundantes no líquido sinovial e contribuem para a patogênese da AR liberando
17 citocinas pró-inflamatórias, EROs, proteases e armadilhas extracelulares de
18 neutrófilos (NETs) (CROIA et al., 2019).

19 No tecido sinovial as células T CD4⁺ se diferenciam principalmente em
20 células T efetoras do tipo Th1, responsáveis pela produção de citocinas pró-
21 inflamatórias, como o interferon gama (IFN- γ) e o TNF- α , e apresentam uma
22 diferenciação deficiente em células T efetoras do tipo Th2, responsáveis pela
23 produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-10 e IL-13 (FIRESTEIN,
24 2009). As citocinas IL-6, IL-21, IL-23, a IL-1 β e o fator de crescimento transformador
25 beta 1 (TGF- β 1), produzidas por macrófagos e células dendríticas, estimulam a
26 diferenciação da célula T CD4⁺ no subtipo Th17. Esse por sua vez, produz as IL-17A,
27 IL-17F, IL-21, IL-22 e o TNF- α . A IL-17 e o TNF- α ativam fibroblastos e condrócitos e
28 inibem a diferenciação de linfócitos T reguladores (Tregs) (GUO et al., 2018). As Tregs
29 exercem seu efeito via secreção de citocinas inibitórias (TGF- β 1 e IL-10) e inibição da
30 ativação imune pela expressão de CTLA-4 que compete por ligantes da coestimulação
31 das células T (WAN, FLAVELL, 2008). Na AR ocorre redução no número e função
32 dessas células, provocando um desequilíbrio entre os linfócitos Th17/Treg que
33 desloca a homeostase em direção à inflamação (MCINNES, SCHETT, 2011).

- 1 **Figura 2** – Células e citocinas envolvidas no desencadeamento e fisiopatologia da
 2 artrite reumatoide.



3

4 Muitas células e suas citocinas desempenham papéis críticos no desenvolvimento da AR. O
 5 compartimento sinovial é infiltrado por leucócitos e o líquido sinovial é inundado com
 6 mediadores pró-inflamatórios produzidos pelas interações de sinoviócitos semelhantes a
 7 fibroblastos com as células do sistema imune inato, incluindo monócitos, macrófagos,
 8 mastócitos, células dendríticas bem como linfócitos T e B. As células endoteliais contribuem
 9 para a extensa angiogênese. O estágio final temos sinóvia hiperplásica, dano à cartilagem,
 10 erosões ósseas e comprometimento sistêmico. A destruição do osso subcondral é o
 11 resultado de uma diminuição da atividade dos osteoblastos e um aumento da atividade de
 12 osteoclastos e do sinoviócitos. FR: fator reumatoide, ACPA: anticorpos anti-proteínas
 13 citrulinadas, IL: interleucina, IFN: interferon, TNF: fator de necrose tumoral, MMPs:
 14 metaloproteinases de matriz, TGF: fator de crescimento transformador, PDGF: fator de
 15 crescimento derivado de plaquetas, GM-CSF: fator estimulador de colônia granulócito-
 16 macrófago, VEGF: fator de crescimento endotelial vascular, FGF: fator de crescimento de
 17 fibroblasto.

18 **Fonte:** Adaptado de Guo et al., 2018.

19 Na fase crônica da AR, a disfunção dos sinoviócitos fibroblastos-símile
 20 leva à hiperplasia da sinóvia, além da produção de citocinas inflamatórias e
 21 proteinases, como metaloproteinases de matriz (MMPs) e inibidores teciduais de

1 metaloproteinases (TIMPs), que promovem a destruição articular (GUO et al., 2018).
2 O dano à cartilagem ocorre por invasão direta do tecido sinovial hiperplásico e por
3 meio de apoptose dos condrócitos mediada especialmente por IL-1 β , IL-17A, EROs e
4 ERNs (MCINNES, SCHETT, 2011). A erosão óssea, marco da AR, parece ser
5 mediada tanto por inflamação quanto pela autoimunidade. Citocinas inflamatórias
6 como o TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-17 podem exercer efeitos pró-osteoclastogênicos e
7 suprimir a formação óssea via RANK-L e o fator estimulador de colônias de
8 macrófagos (OKAMOTO et al., 2017). O mecanismo relacionado à autoimunidade
9 refere-se à ativação e diferenciação dos osteoclastos induzida por anticorpos contra
10 proteínas citrulinadas, levando à reabsorção e perda óssea (HARRE et al., 2012).

11 1.1.1.1 Papel das células T reguladoras na artrite reumatoide

12 A maioria dos estudos observou menor porcentagem de Tregs
13 circulantes em pacientes com AR comparado com indivíduos saudáveis (CAO et al.,
14 2004; JIAO et al., 2007; KAWASHIRI et al., 2011; NIU et al., 2012; SEMPERE-
15 ORTELLS et al., 2009), sugerindo então uma falha na tolerância periférica, o que
16 poderia contribuir para a inflamação autoimune na AR. Outros estudos reportaram
17 aumento do número de Tregs, como mecanismo compensatório em resposta à
18 inflamação (HAN et al., 2008; VAN AMELSFORT et al., 2004), enquanto outros
19 estudos não encontraram diferenças no número de Tregs entre pacientes com AR e
20 controles (DEJACO et al., 2010; DOMBRECHT et al., 2006; JI et al., 2013; LIU et al.,
21 2005; LIN et al., 2007). Em relação à associação entre Tregs e atividade da AR os
22 resultados também são contraditórios (HAN et al., 2008; JI et al., 2013; KAWASHIRI et
23 al., 2011; NIU et al., 2012; SEMPERE-ORTELLS et al., 2009), com estudos que
24 demonstram uma relação inversa entre DAS28 e a número de Tregs (KAWASHIRI et
25 al., 2011; NIU et al., 2012) e outros uma porcentagem aumentada de Tregs em
26 pacientes com AR ativa (JI et al., 2013; SEMPERE-ORTELLS et al., 2009). Essas
27 discrepâncias provavelmente se devem a diferenças na definição de Tregs em termos
28 de marcadores de superfície, como o CD25, e da expressão do fator de transcrição
29 *forkhead box P3* (FoxP3) (ALUNNO et al., 2015), além da influência de fatores
30 confundidores como idade (LAWSON et al., 2006) e uso de glicocorticoides (CAO et
31 al., 2004).

1 As Tregs exercem um papel essencial na prevenção de autoimunidade,
2 inibindo a proliferação de células T efectoras e a produção de citocinas (DAVIDSON et
3 al., 2007; SAKAGUCHI, 2005; ZHENG et al., 2007). Esses efeitos são mediados via
4 contato célula-célula ou por meio da secreção de citocinas, em especial o TGF- β 1 e
5 a IL-10 (NIE et al., 2015; WANG, ZHENG, 2013). O TGF- β 1 inibe a diferenciação de
6 linfócitos T citotóxicos, células Th1 e Th2, enquanto promove a diferenciação de Tregs
7 e, na presença de IL-6 de células Th17 (SANJABI, OH, LI, 2017). Em relação aos
8 linfócitos B, o TGF- β 1 inibe sua proliferação e induz apoptose, inibe a troca do isotipo
9 IgG e promove a produção de anticorpos IgA (EHRHARDT et al., 1992; KEHRL et al.,
10 1991; VAN VLASSELAER, PUNNONEN, DE VRIES, 1992). Dessa forma, a
11 deficiência de TGF- β 1 promove a expansão e sobrevivência dos linfócitos B e a produção
12 de anticorpos (CAZAC, ROES, 2000; KEE et al. 2001; SANJABI, OH, LI, 2017;
13 WARNER et al. 1992). Além do seu papel imunomodulador, o TGF- β 1 estimula a
14 angiogênese, induz componentes da matriz extracelular, desempenhando um papel
15 essencial na cicatrização e na indução de fibrose tecidual (BLOBE, SCHIEMANN,
16 LODISH, 2000) (Figura 3).

17

18

19

20

21

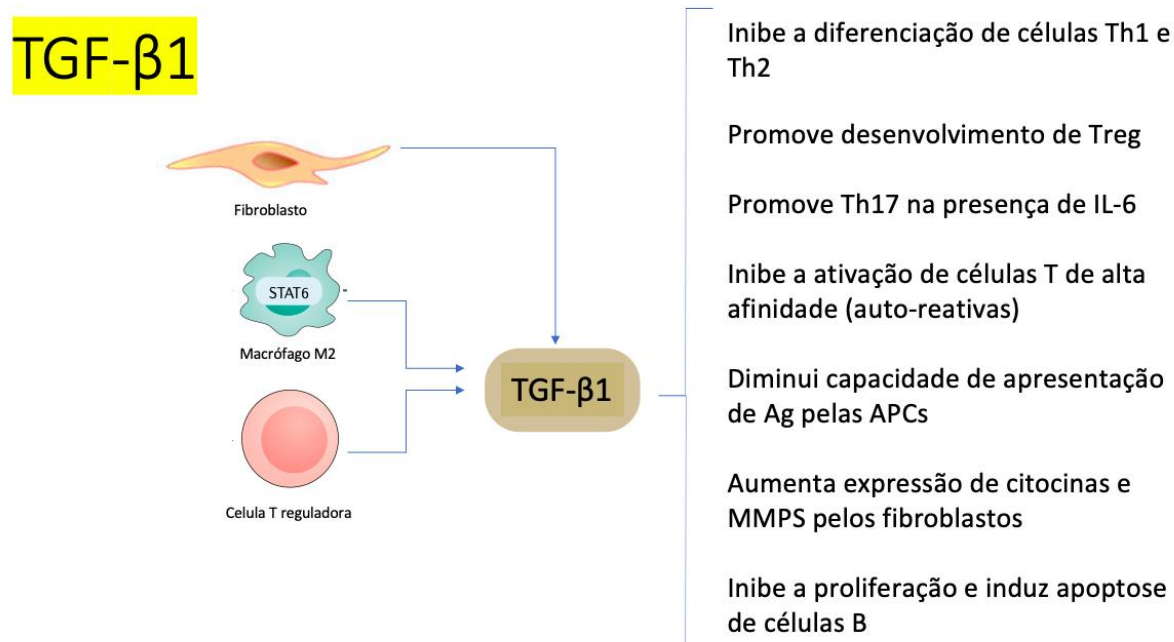
22

23

24

25

- 1 **Figura 3** – Ação do fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1) na artrite
2 reumatoide.



3

4 TGF- β 1: fator de crescimento transformador beta 1, STAT6: transdutor de sinal e ativador da
5 transcrição 6, Th: T *helper*, Treg: célula T reguladora, IL: interleucina, Ag: antígenos, APCs:
6 células apresentadoras de antígenos, MMPS: metaloproteinases de matriz.

7 **Fonte:** Adaptado de Chen et al., 2019.

8

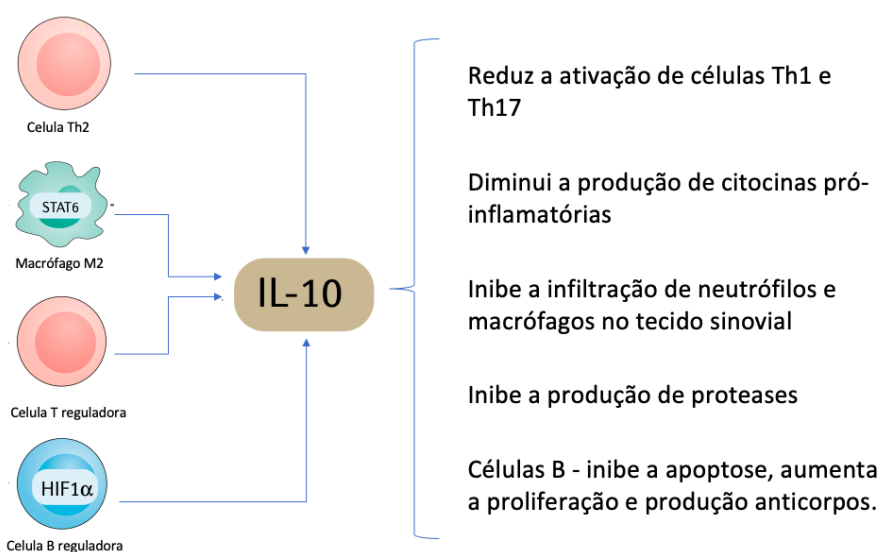
9 Os estudos que avaliaram o líquido e tecido sinovial de pacientes com
10 AR são mais consistentes e demonstraram níveis elevados de TGF- β 1 (GONZALO-
11 GIL et al, 2013; MIELIAUSKAITE et al., 2009; SONG et al., 2010; WARSTAT et al.,
12 2010). No entanto, em relação aos níveis séricos de TGF- β 1, foram relatados níveis
13 elevados (HARMAN et al. 2017; MIELIAUSKAITE et al., 2019) assim como níveis
14 séricos reduzidos em relação aos controles saudáveis (NIU et al., 2012; HASHEMI et
15 al., 2018). Níveis de TGF- β 1 não diferiram entre o grupo AR e grupo controle em
16 recente metanálise de Lee e Bae (2017). Harman et al. (2017) observaram que os
17 níveis elevados de TGF- β 1 em pacientes com AR não apresentaram associação com
18 parâmetros clínicos, VHS, PCR e DAS28. De maneira semelhante, Mieliauskaite et al.
19 (2019) não observaram correlação com VHS e DAS28, porém houve correlação
20 positiva entre os níveis séricos de TGF- β 1 com o dano articular. Contrariamente, Niu
21 et al. (2012) encontraram níveis séricos reduzidos em relação aos controles e ainda

1 mais baixos nos pacientes com AR ativa, sugerindo uma alteração funcional ou
2 quantitativa das Tregs.

3 Além do TGF- β 1, as Tregs mediam sua ação por meio da IL-10. A IL-10
4 exerce um efeito imunorregulador na AR de diversas maneiras (figura 4), tais como
5 inibição da capacidade dos monócitos e macrófagos em apresentar antígenos às
6 células T e diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-
7 1, IL-6, IL-8 e IL-12 (CHUNG, 2001; LINDSAY, HODGSON, 2001; LIU et al., 2018;
8 OGAWA, DURU, AMEREDES, 2008; VAN ROON et al., 2001); inibição da produção
9 de MMP e indução da expressão de TIMPs (VAN ROON et al., 2001), redução da
10 expressão das enzimas ciclo-oxigenase 2 e óxido nítrico sintase, quimiocinas e
11 prostaglandina E2 (ASADULLAH et al., 2003; GRUTZ, 2005; WILLIAMS et al., 2004).
12 Além disso a IL-10 estimula a proliferação, diferenciação e sobrevivência dos linfócitos B
13 (LEVY, BROUET, 1994; ROUSSET et al., 1995; BURDIN, ROUSSET,
14 BANCHEREAU, 1997) e promove a troca de isotipo dos anticorpos (DEFRANCE et
15 al., 1992; JEANNIN et al., 1998). Na AR, foi observado que a IL-10 induziu linfócitos
16 B a produzirem FR e anti-CCP (DEFRANCE et al., 1992; PEREZ, ORTE, BRIEVA,
17 1995; REPARON-SCHUIJT et al., 2001).

18 **Figura 4** – Ação da interleucina-10 (IL-10) na artrite reumatoide.

IL10



19

20 IL: interleucina; STAT6: transdutor de sinal e ativador da transcrição 6, HIF: fator induzível por
21 hipóxia, Th: T *helper*, FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpos contra peptídeos citrulinados
22 cíclicos

23 **Fonte:** Adaptado de Chen et al., 2019.

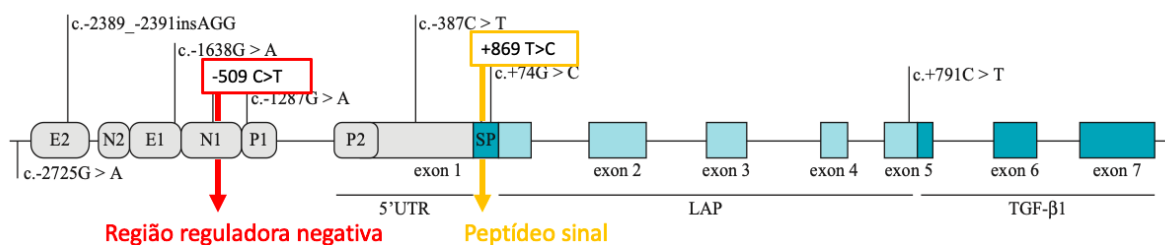
1 Níveis séricos elevados de IL-10 foram encontrados em pacientes com
2 AR em comparação com controles saudáveis (GE et al., 2015; RAHMAN et al., 2005;
3 SHRIVASTAVA et al., 2015; YING et al., 2011) como mecanismo compensatório pela
4 sua ação anti-inflamatória, porém outros dois estudos (HASHEMI et al., 2018; QU et
5 al., 2019) observaram níveis séricos reduzidos de IL-10 correlacionado com maiores
6 níveis de IL-17 e possível função reduzida das células Tregs. A relação entre os níveis
7 séricos de IL-10 e a atividade da doença também é controversa. Shrivastava et al.
8 (2015) avaliaram 110 pacientes com AR comparado com 55 controles saudáveis e
9 encontraram correlação negativa entre os níveis de IL-10 com a PCR e o DAS28; no
10 entanto, Rahman et al. (2005) encontraram correlação positiva entre a IL-10 com VHS
11 e PCR em 30 pacientes com AR. Contrariamente, Milnan e colaboradores (2010)
12 avaliaram 47 pacientes com AR e não encontraram correlação entre os níveis de IL-
13 10 e o DAS28.

14 1.2 VARIANTES GENÉTICAS -509 C>T (RS1800469) E +869 T>C (RS1800470) DO 15 *TGFB1*

16 O gene *TGFB1* está localizado no braço longo do cromossomo 19 na
17 posição 13.2. (CHEN et al., 2012). A variante *TGFB1* -509 C>T (rs1800469) está
18 localizada na primeira região reguladora negativa, e o alelo T foi associado a níveis
19 elevados de TGF- β 1 devido à perda de regulação negativa (SHAH et al., 2006).
20 Indivíduos com o genótipo TT apresentaram expressão gênica aumentada de TGF- β
21 em comparação com o genótipo CC em outras doenças como fibrilação atrial e
22 adenocarcinoma gástrico (CAO et al., 2004; GUO et al., 2011). A variante *TGFB1* +869
23 T>C está localizada na sequência do peptídeo sinal, que tem por função fazer o
24 deslocamento da proteína recém-sintetizada através da membrana do retículo
25 endoplasmático (VERNER, SCHATZ, 1988). A substituição T>C da variante *TGFB1*
26 +869 pode afetar a função do peptídeo sinal e conseqüentemente o tráfego intracelular
27 da pré-pró-proteína TGF- β 1 e, por fim, os níveis séricos de TGF- β 1 (YAMADA et al.,
28 2000). O genótipo CC do *TGFB1* +869 foi associado a níveis elevados de TGF- β 1 em
29 pacientes com AR (HUSSEIN et al., 2014).

30

- 1 **Figura 5** – Estrutura do gene *TGFB1* e localização das variantes -509 C>T
 2 (rs1800469) e +869 T>C (rs1800470).



- 3
- 4 E: região ativadora; N: região reguladora negativa; P: região promotora; A: adenina; G:
 5 guanina; C: citosina; T: timina; UTR: região não traduzida; LAP: peptídeo associado à latência;
 6 TGF-β1: fator de crescimento transformador beta-1.

7 **Fonte:** Adaptado de Cebinelli et al., 2016

8

9 Vários estudos sobre a associação de variantes do *TGFB1* com o risco
 10 de desenvolver AR foram realizados nas últimas décadas com resultados
 11 discordantes entre eles (PANOULAS et al., 2009; HUSSEIN et al., 2014; KIM et al.,
 12 2004; PATEL et al., 2020; SUN et al., 2019). Metanálise de Lee e Bae (2017)
 13 demonstrou uma associação entre o alelo T do *TGFB1* +869 T>C com AR em asiáticos
 14 e árabes, mas não em europeus. E, em relação à variante *TGFB1* -509 C>T, não foi
 15 encontrada associação com AR.

16 Kim et al. (2004) avaliaram a associação de 5 variantes genéticas do
 17 *TGFB1* com a suscetibilidade à AR e à gravidade da progressão radiográfica em 143
 18 pacientes na Coreia do Sul. Em relação às variantes -509 C>T e +869 T>C, a
 19 frequência genotípica e alélica não diferiu entre o grupo AR e controles. A gravidade
 20 das alterações radiográficas nas mãos foi avaliada pelo escore Sharp modificado
 21 (ESM) em 122 pacientes com AR. Houve correlação positiva entre o ESM e a duração
 22 da doença para cada genótipo da variante -509 C>T. A presença do alelo T (TT+CT)
 23 conferiu maior velocidade de progressão radiográfica da doença do que o genótipo
 24 CC. Essa correlação não foi observada para a variante +869 T>C.

25 Em 2009, Kobayashi e colaboradores avaliaram 16 variantes genéticas
 26 de citocinas e sua associação com doença periodontal em uma amostra da população
 27 japonesa que incluiu 153 pacientes com AR, 117 adultos com periodontite apenas e

1 108 indivíduos saudáveis. Em relação às variantes -509 C>T e +869 T>C do *TGFB1*,
2 a distribuição genotípica e alélica não diferiu entre os grupos.

3 Chen et al. (2012) avaliaram na população inglesa a associação de 3
4 variantes genéticas do *TGFB1* (-509 C>T, +868 T>C e +913 G>C) com a presença de
5 cardiopatia isquêmica (CI) e/ou infarto agudo do miocárdio (IAM) em 414 pacientes
6 com AR, além da relação entre essas variantes e os níveis de TGF- β 1 em 399
7 pacientes. Não houve associação entre os níveis séricos de TGF- β 1 com as variantes,
8 assim como com a CI e IAM.

9 Já em relação à variante *TGFB1* +869 T>C (descrita como rs1800470
10 ou rs1982073) diversos estudos avaliaram a suscetibilidade à AR (CHANG et al.,
11 2010; ZHANG et al., 2013; ZHOU, T. B. et al., 2014); porém, são escassos e
12 controversos os dados em relação à associação com atividade e progressão
13 radiográfica da doença, assim como com os níveis de TGF- β 1, conforme sintetiza a
14 tabela 4. Os diferentes resultados podem ser explicados pelo tamanho das amostras,
15 pelos métodos de genotipagem utilizados, a origem dos controles, as diversas etnias,
16 IMC dos indivíduos e tipo de medicamento utilizado no tratamento da AR.

Tabela 4 – Variante genética +869 T>C (rs1800470) do *TGFB1* avaliada em pacientes com artrite reumatoide.

Estudo (país)	População	Amostra	Frequência Alélica	Efeito
Kobayashi et al, 2009 (Japão)	Asiática	Casos:153 Controles: 108	Caso: T=0,558/C=0,442 Controle: T=0,505/C=0,495	Não houve associação com AR.
Alayli et al., 2009 (Turquia)	Caucasiana	Casos: 131 Controles: 133	Caso: T=0,634/C=0,366 Controle: T=0,602//C=0,398	Não houve associação com AR. Alelo T foi associado com FR (OR=1,92, IC 95%=1,08-3,40, p=0,02). Não houve associação com dano radiográfico.
Mattey et al., 2005 (Reino Unido)	Caucasiana	Casos: 208 Controles: 0	Caso: T=0,606/C=0,393	Não houve associação com dano radiográfico.
Sugiura et al., 2002 (Japão)	Asiática	Casos: 155 Controles: 110	Caso: T=0,516/C=0,483 Controle: T=0,459/C=0,541	O alelo T foi associado com suscetibilidade à AR (p=0,039).
Panoulas et al., 2009 (Reino Unido)	Caucasiana	Casos: 395 Controles: 401	Caso: T=0,630/C=0,370 Controle: T=0,633/C=0,366	Não houve associação com AR, DAS28 e FR. Frequência de anti-CCP maior no genótipo TT x CT+CC (p=0,024)
Saad et al., 2015 (Egito)	Não caucasiana	Casos: 105 Controles: 80	Caso: T=0,500/C=0,500 Controle: T=0,416/C=0,584	Genótipo CC protetor (OR=0,364, IC 95%=0,184-0,720, p=0,003).
Patel et al., 2020 (Índia)	Asiática	Casos: 76 Controles: 87	Caso: T=0,730/C=0,270 Controle: T=0,247/C=0,753	Suscetibilidade, genótipo TT (OR=0,04, IC 95%=0,01-0,09, p=0,001) e alelo T (OR=8,25, IC 95%=5,02-3,56, P=0,001). Não houve associação com DAS28 e FR.
Hussein et al., 2014 (Egito)	Não caucasiana	Casos: 160 Controles: 168	Caso: T= 0,672/C=0,0328 Controle: T=595/C=0,405	O alelo T foi associado com suscetibilidade à AR (OR=1,4, IC 95%=1,0-1,09, p=0,025). Genótipo CC

associado com maiores níveis de TGF- β 1. Genótipo T e presença de FR associados com dano radiográfico (OR=3,3, IC 95%=1,2-9,4, p=0,017).

Pokorny et al., 2003 (Nova Zelândia)	Caucasiana	Casos: 117 Controles: 140	Caso: T=0,520/C=0,480 Controle: T=0,560/C=0,440	Não houve associação com AR, nem com FR nem com dano radiográfico.
Sun et al., 2019 (China)	Asiática	Casos: 150 Controles: 150	Caso: T=0,560/C=0,440 Controle: T=0,440/C=0,560	Papel protetor do genótipo CC (OR=2,834, IC 95%=1,384-6,547, p=0,015).
Kim et al., 2004 (Coréia)	Asiática	Casos: 143 Controles: 148	Caso: T=0,510/C=0,490 Controle: T=0,510/C=0,49	Não houve associação com AR nem com dano radiográfico.
Chen et al., 2012 (Inglaterra)	Caucasiana	Casos: 414 Controles: 0	Caso: T=0,635/C=0,365	Não houve associação com AR.

Continuação da tabela 4.

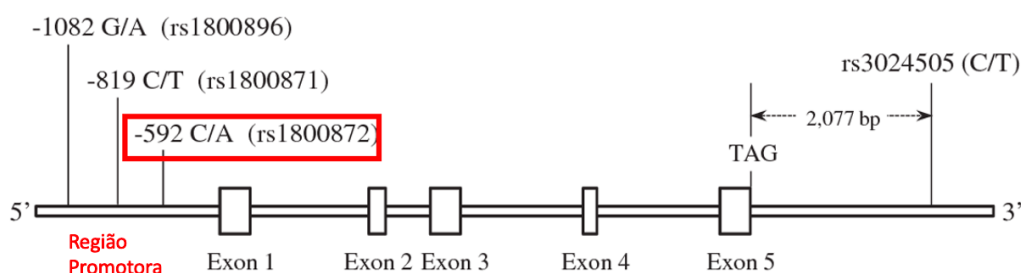
T: timina; C: citosina; AR: artrite reumatoide; FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpos contra peptídeo citrulinado cítrico; TGF- β 1: fator de crescimento transformador beta-1; DAS28: *Disease Activity Score 28*; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

Fonte: o próprio autor.

1.3 VARIANTE GENÉTICA -592 C>A (RS1800872) DO GENE *IL10*

O gene *IL10* está localizado no cromossomo 1 (q31-32) (KIM et al., 1992). As três variantes mais estudadas do gene *IL10* encontram-se na região promotora (-1082 G>A, -819 C>T e -592 C>A) e estão associadas à produção de IL-10 e com a patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes (SALIM et al., 2013; SONG et al., 2013; RAMKUMAR et al., 2012; ZHOU, J. et al., 2014). Estudos prévios demonstraram que o genótipo *IL10* -592 CC foi associado com níveis séricos elevados (GE et al., 2015) e o alelo A com níveis reduzidos de IL-10 em pacientes com AR comparado com indivíduos controles (HEE et al., 2007).

Figura 6 – Estrutura do gene *IL10* e localização da variante -592 C>A (rs1800872).



As variantes de nucleotídeos únicos estão indicadas com a posição e as variantes do alelo (alelo principal / alelo secundário), seguido pelo número rs. G: guanina; A: adenina; C: citosina; T: timina; TAG: marcador de sequência genética; bp: pares de base.

Fonte: Adaptado de Mijac et al., 2016.

Ge et al. (2015) avaliaram 90 pacientes com AR e encontraram uma associação significativa entre a variante -592 A>C do gene *IL-10* e a produção de IL-10, sendo que o genótipo CC apresentou níveis séricos de IL-10 mais elevados que o genótipo AC. Ying et al. (2011) também encontraram níveis séricos de IL-10 mais elevados em pacientes com AR com genótipo CC em relação ao genótipo AC e AA (10 pacientes avaliados para cada genótipo, $p < 0.05$). Hee et al. (2007) encontraram níveis séricos de IL-10 menores para o genótipo AC ($p = 0.02$) e para o genótipo AA ($p = 0.015$) em 84 pacientes com AR comparado com 95 controles.

1 Uma metanálise recente, de Liu e colaboradores (2018), avaliou a
2 associação da variante -592 C>A com a suscetibilidade à AR. Foram incluídos 11
3 estudos com 2141 pacientes e 2591 controles. A análise encontrou uma associação
4 significativa entre AR e 2 modelos genéticos na população caucasiana (modelo
5 codominante AC vs AA e modelo dominante AC+CC vs AA).

6 A tabela 5 sintetiza os dados de diversos estudos que avaliaram a
7 variante genética -592 C>A do gene *IL10* e a suscetibilidade à AR, além da relação
8 com parâmetros clínicos, laboratoriais e de atividade da doença. Novamente, os
9 diferentes resultados podem ser explicados pelo tamanho das amostras, pelos
10 métodos de genotipagem utilizados, a origem dos controles, as diversas etnias, idade
11 e IMC dos indivíduos, além do tipo de medicamento utilizado no tratamento da AR.

12

13

Tabela 5 – Variante -592 C>A (rs1800872) do gene *IL10* avaliada em pacientes com artrite reumatoide.

Estudo (país)	População	Amostra	Frequência Alélica	Efeito
Ciccacci et al, 2016 (Itália)	Caucasiana	Casos:192 Controles: 278	Caso: G=0,747/T=0,252 Controle: G=0,690/T=0,309	Suscetibilidade. Genótipos GT e TT menor risco de desenvolver AR do que GG (OR=0,63, IC 95%=0,43-0,91, p=0,014.) O alelo T foi associado a FR positivo (OR=2, IC 95%=1,06-3,8, P=0,032).
Ates et al., 2008 (Turquia)	Caucasiana	Casos: 98 Controles: 122	Caso: C=0,698/A=0,301 Controle: C=0,688/A=0,311	Não houve associação da variante com AR. Não houve associação com FR e doença erosiva.
Ge et al., 2015 (China)	Asiática	Casos: 597 Controles: 839	Caso: C=0,345/A=0,654 Controle: C=0,307/A=0,692	Genótipo CC foi associado com maior risco de AR (OR 1,59, IC 95%=1,10-2,30, p=0,015), PCR positivo, anti-CCP e FR positivos, VHS elevado e DAS28≥3,2. Em um subgrupo de AR, o genótipo CC teve maiores níveis de IL10 que o genótipo AC (p=0,004).
Ying et al., 2011 (China)	Asiática	Casos: 164 Controles: 196	Caso: C=0,402/A=0,597 Controle: C=0,540/A=0,459	O alelo A (OR=1,318, IC 95%=1,139-1,525, p=0,008) foi associado com suscetibilidade à AR e anti-ccp positivo títulos baixos. Os níveis de IL10 diferiram entre os genótipos: CC>CA>AA (p<0,05).
Hernandez-Bello et al., 2017 (México)	Caucasiana	Casos: 240 Controles: 240	Caso: C=0,581/A=0,418 Controle: C=0,620/A=0,379	Não houve associação com AR nem com parâmetros clínicos e laboratoriais.
Paradowska-Gorycka et al., 2010 (Polônia)	Caucasiana	Casos: 244 Controles: 106	Caso: C=0,778/A=0,221 Controle: C=0,976/A=0,023	Suscetibilidade com os genótipos CA e AA e o alelo A. Não houve associação com DAS28.

Gambhir et al., 2010 (Índia)	Asiática	Casos: 222 Controles: 208	Caso: C=0,642/A=0,357 Controle: C=0,610/A=0,389	O alelo A teve associação com DAS28 elevado, especialmente em mulheres (p=0,045). Não houve associação com erosões, deformidades e FR.
Trajkov et al., 2009 (Macedônia)	Caucasiana	Casos: 85 Controles: 301	Caso: C=0,670/A=0,329 Controle: C=0,710/A=0,289	Não houve associação com AR.
Hee et al., 2007 (Malásia)	Asiática	Casos: 84 Controles: 95	Caso: C=0,363/A=0,636 Controle: C=0,468/A=0,531	O alelo A foi associado com suscetibilidade a AR (OR=1,55, IC 95%=1,01-2,36, p=0,044). Não houve associação com FR, erosões ósseas ou deformidades.
Moreno et al., 2007 (Colômbia)	Caucasiana	Casos: 102 Controles: 102	Caso: C=0,672/A=0,328 Controle: C=0,701/A=0,299	Não houve associação com AR nem com FR.
Pawlik et al., 2005 (Polônia)	Caucasiana	Casos: 95 Controles: 104	Caso: C=0,757/A=0,242 Controle: C=0,735/A=0,264	Não houve associação com AR.
Marinou et al., 2007 (Reino Unido)	Caucasiana	Casos: 964 Controles: 0	Caso: C=0,800/A=0,200	O genótipo CC foi associado com maior dano radiográfico apenas em pacientes com anti-CCP e FR negativos (p=0,002). Não houve associação do genótipo com FR e anti-CCP.
Hajeer et al., 1998 (Reino Unido)	Caucasiana	Casos: 234 Controles: 238	Caso: C=0,78/A=0,22 Controle: C=0,79/A=0,21	Não houve associação com AR.

Continuação tabela 5.

C: citosina; A: adenina; G: guanina; T: timina; AR: artrite reumatoide; FR: fator reumatoide; anti-CCP: anticorpos contra peptídeo citrulinado cítrico; IL-10: interleucina 10; DAS28: *Disease Activity Score 28*; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

Fonte: o próprio autor.

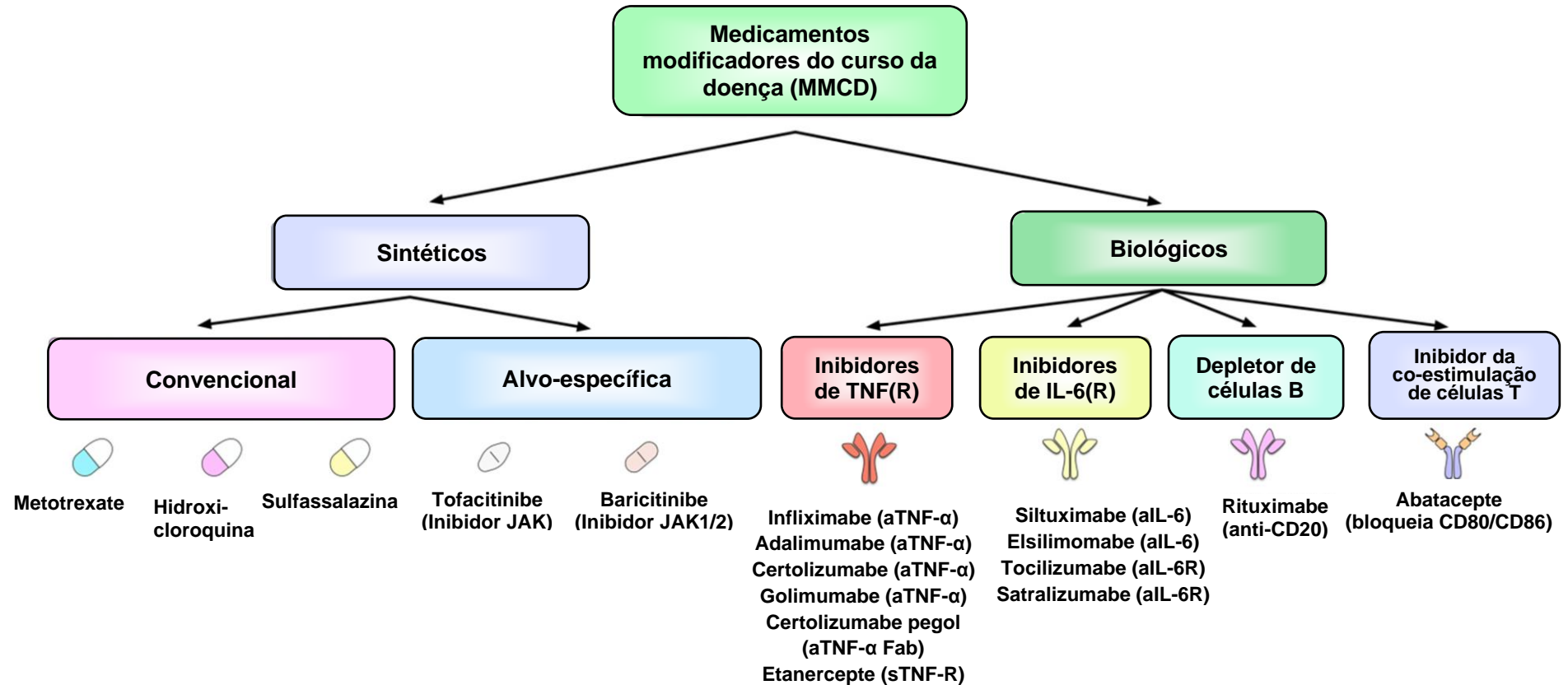
1 1.4 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO

2 O objetivo terapêutico na AR é atingir o nível mínimo de atividade ou,
3 preferencialmente, a remissão da doença, o que implica em menor progressão
4 radiográfica e melhor evolução funcional. O tratamento medicamentoso inclui o uso
5 de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), glicocorticoides, medicamentos
6 modificadores do curso da doença (MMCD) - sintéticos e biológicos (Figura 4). Os
7 glicocorticoides, em particular a prednisona e a prednisolona, e os AINEs podem ser
8 prescritos para o controle sintomático, tendo sempre em mente o uso da menor dose
9 pelo menor tempo possível devido aos seus efeitos adversos (MINISTÉRIO DA
10 SAÚDE, 2020).

11 Os MMCD sintéticos (MMCDs) incluem o metotrexato (MTX), a
12 hidroxicloroquina (HCQ), a cloroquina, a leflunomida (LEF) e a sulfassalazina (SSZ),
13 todos de uso via oral. O MTX inibe a síntese de DNA, RNA, timidinato e proteínas, e
14 na AR, seus efeitos anti-inflamatórios parecem estar relacionados com a modulação
15 do metabolismo da adenosina e com os efeitos possíveis nas vias do fator de necrose
16 tumoral. O MTX tem opção de uso via parenteral (PEREIRA et al., 2009). A HCQ e a
17 cloroquina são medicamentos antimaláricos cujo mecanismo imunomodulador ainda
18 é pouco conhecido, mas parece envolver múltiplos fatores: estabilização das
19 membranas lisossomais, inibição de enzimas lisossômicas e da quimiotaxia e
20 fagocitose de polimorfonucleares, interferência na produção de prostaglandinas, entre
21 outros (CLARK et al., 1993). A LEF possui atividade anti-proliferativa através da
22 inibição da enzima diidroorotato desidrogenase, envolvida na síntese da pirimidina
23 (ROZMAN, 2002). A SSZ tem potencial de inibir a produção de prostaglandinas, de
24 inibir funções neutrofílicas e linfocitárias e quimiotaxia (BOERS et al., 1998). O
25 tofacitinibe é um medicamento modificador do curso da doença sintético alvo-
26 específico, inibidor seletivo das janus quinases (JAKs) 1 e 3 (O'SHEA et al., 2013),
27 prescrito na dose um comprimido de 5 mg duas vezes ao dia (figura 4).

28 Os MMCD biológicos (MMCDbio) incluem os inibidores de TNF- α e os
29 não inibidores de TNF- α (figura 4). A descrição dos medicamentos biológicos e os
30 esquemas de administração encontram-se no quadro 1.

Figura 7 – Visão geral sobre os medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD).



Os diferentes medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) são divididos em sintéticos (MMCDs) e biológicos (MMCDbio). Os MMCDs são subdivididos em convencionais (metotrexate, hidroxicloroquina, sulfassalazina) e alvo-específicos (tofacitinibe). Os MMCDbio incluem os inibidores de TNF- α , um inibidor do receptor da IL-6, um depletor de linfócito B e um inibidor da coestimulação dos linfócitos T. JAK: *janus activated kinase*; aIL-6: anti interleucina 6; aIL-6R: anti receptor de IL-6; aTNF- α : anti fator de necrose tumoral α ; sTNF-R: anti receptor de TNF solúvel; Fab: fragmento de anticorpo.

Fonte: Adaptado de Lin et al., 2020.

1 **Quadro 1** – Medicamentos modificadores do curso da doença biológicos (MMCDBio)

Classe	Medicamento	Tipo de agente	Via	Posologia
Inibidores de TNF-α.	Adalimumabe	anticorpo humano contra o TNF- α .	SC	40mg cada 2 semanas
	Certolizumabe pegol	fragmento Fab de um anticorpo anti-TNF- α humanizado conjugado com duas moléculas de polietilenoglicol	SC	400 mg nas semanas 0, 2 e 4. Após, manter 200 mg a cada duas semanas ou 400 mg a cada quatro semanas
	Etanercepte	proteína de fusão composta pelo receptor solúvel do TNF- α mais a região Fc da IgG	SC	50 mg uma vez na semana
	Golimumabe	anticorpo monoclonal humano anti-TNF- α	SC	50 mg cada 4 semanas
	Infliximabe	anticorpo monoclonal anti-TNF- α quimérico humano-murino	EV	3 mg/kg/dose nas semanas 0, 2, 6. Depois de manter a mesma dose, a cada 8 semanas.
Não Inibidores de TNF-α.	Tocilizumabe	anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao receptor de IL-6, inibindo o efeito biológico da IL-6	EV	8 mg/kg/dose (dose máxima de 800 mg) a cada 4 semanas.
	Abatacepte	proteína de fusão CTLA-4-IgG que atua como inibidor de moléculas de coestimulação dos linfócitos T	EV ou SC	EV: 500 mg (pacientes com menos de 60 kg); 750 mg (entre 60 e 100 kg) e 1.000 mg (acima de 100 kg) nas semanas 0, 2 e 4. Após, manter a cada 4 semanas. SC: 125 mg uma vez na semana
	Rituximabe	anticorpo monoclonal quimérico dirigido contra o linfócito CD20+	EV	1.000 mg nos dias 0 e 14. Após, a cada 6 meses

2 TNF: fator de necrose tumoral; IL-6: interleucina 6; CTLA: antígeno de linfócito T citotóxico;
3 IgG: imunoglobulina G; SC: via subcutânea, EV: via endovenosa

4 **Fonte:** Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde, 2020.

5

6

7

8 O tratamento imunossupressor com determinadas drogas pode reduzir
9 os níveis de FR e anti-CCP e, dessa forma, predizer resposta terapêutica (BURSKA et
10 al., 2014; INGEGNOLI, CASTELLI, GUALTIEROTTI, 2013; VERHEUL et al., 2015). A
11 positividade do FR parece predizer uma melhor resposta clínica ao rituximabe e ao
12 tocilizumabe (INGEGNOLI, CASTELLI, GUALTIEROTTI, 2013; MANEIRO et al., 2013;
13 SONG, KANG, 2010). Em pacientes com anti-CCP positivo, especialmente em altos
14 títulos, a monoterapia com metotrexate parece ser insuficiente exigindo então um
tratamento inicial mais agressivo (VISSER et al., 2010; WILLEMZE et al., 2012). Além

1 disso, o abatacepte e o rituximabe parecem mais eficazes em pacientes com anti-CCP
2 positivo (GARDETTE et al., 2014; KANBE, CHIBA, NAKAMURA, 2013; PIEPER et al.,
3 2013).

4 No Brasil, o último Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite
5 Reumatoide (PCDT-AR) do Ministério da Saúde, de 16 de março de 2020,
6 regulamenta o tratamento medicamentoso com base em etapas e linhas terapêuticas.
7 Na primeira etapa entram os MMCDs, sendo o MTX a primeira escolha. Na
8 impossibilidade do uso do MTX por toxicidade, deve-se usar preferencialmente o LEF
9 ou SSZ. Em caso de persistência da atividade de doença após 3 meses de tratamento
10 otimizado com a monoterapia inicial (MTX, LEF ou SSZ), passa-se para a terapia com
11 a combinação dupla ou tripla de MMCDs, sendo as associações mais comumente
12 recomendadas as de MTX ou LEF com HCQ ou SSZ. Após o uso de pelo menos dois
13 esquemas terapêuticos na primeira etapa por no mínimo 3 meses cada um e havendo
14 persistência da atividade da doença, parte-se para a segunda etapa, onde utiliza-se
15 um MMCDbio ou o tofacitinibe. Os MMCDbio que podem ser usados são os inibidores
16 de TNF- α (certolizumabe pegol, golimumabe, infliximabe, etanercepte e
17 adalimumabe) e os não inibidores de TNF- α (abatacepte e tocilizumabe). O uso do
18 rituximabe deve ser reservado somente aos indivíduos com contraindicação absoluta
19 a todos os MMCDbio citados anteriormente. Após pelo menos 3 meses da segunda
20 etapa terapêutica, e havendo persistência da atividade da doença ou toxicidade ao
21 medicamento, pode-se prescrever outro MMCDbio (inibidores de TNF- α ou não
22 inibidores de TNF- α) ou o tofacitinibe (Terceira etapa). O algoritmo de decisão
23 terapêutica do PCDT-AR está apresentado na figura 5.

24

25

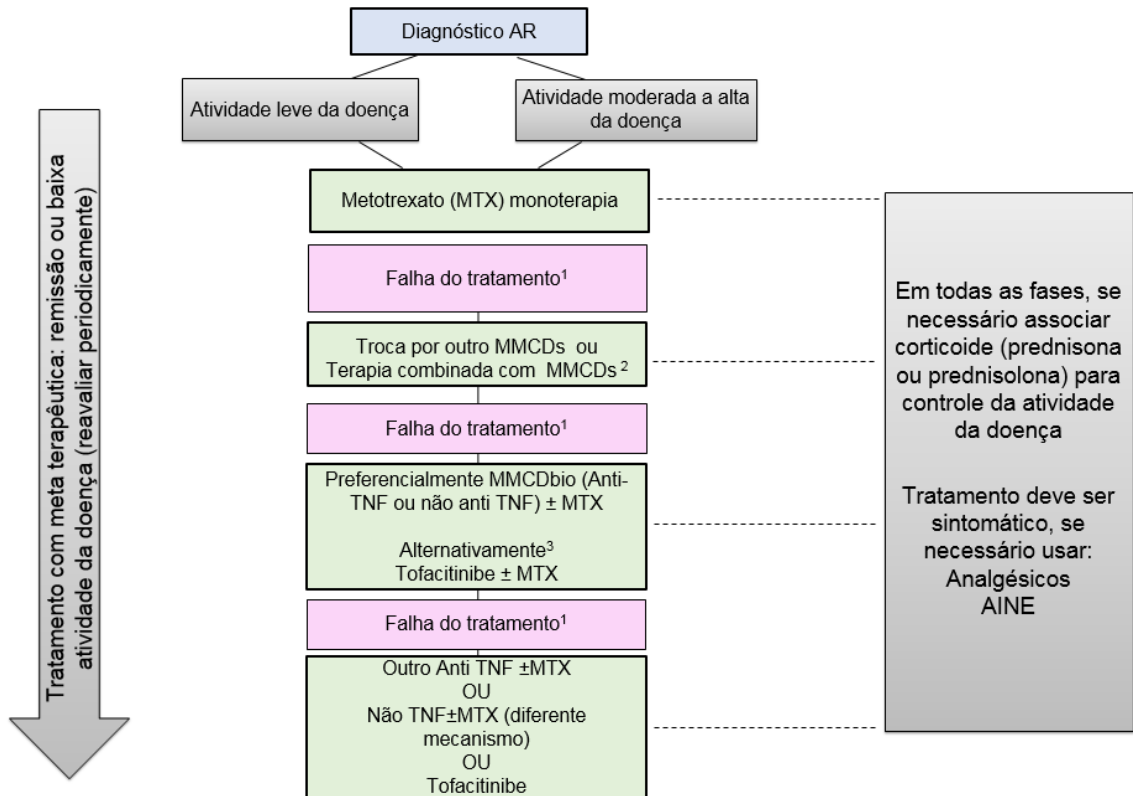
26

27

28

29

1 **Figura 8** – Algoritmo de decisão terapêutica da artrite reumatoide.



2

3 1) Falha do tratamento: por eventos adversos intoleráveis ou não atingimento da meta
4 terapêutica. Deve-se aguardar pelo menos 3 meses do tratamento vigente para troca de linha
5 ou etapa terapêutica. 2) Pode ser considerada substituição por metotrexate (MTX) injetável,
6 leflunomide, terapia dupla ou tripla, sem MTX oral. 3) Vantagens do tofacitinibe: ser usado por
7 via oral e não necessitar refrigeração para armazenamento. MMCDs: Medicamentos
8 Modificadores do Curso da Doença sintéticos; MMCDbio: Medicamentos Modificadores do
9 Curso da Doença Biológicos; Anti-TNF: inibidores do TNF- α ; AINE: anti-inflamatórios não
10 esteroidais.

11

12 **Fonte:** BRASIL.Ministério da Saúde, 2020.

13

14

1 2 JUSTIFICATIVA

2 Diante da fisiopatologia complexa e multifatorial da AR, o estudo das
3 variantes genéticas permite avaliar sua associação com a suscetibilidade à doença
4 em uma amostra da nossa população, bem como avaliar o papel dessas variantes em
5 relação à atividade da doença, autoimunidade e níveis de citocinas.

6 Dentre os escassos estudos que avaliaram a variante -509 C>T
7 (rs1800469) do *TGFB1* em pacientes com AR, apenas um deles avaliou
8 concomitantemente os níveis de TGF- β 1 e outro estudo a suscetibilidade ao dano
9 articular na AR. Apesar de maior número de estudos com as variantes -592 C>A
10 (rs1800872) do gene *IL10* e +869 T>C (rs1800470) do *TGFB1*, os resultados quanto
11 à frequência e sua associação com a suscetibilidade à AR, autoanticorpos, atividade
12 de doença e níveis dessas citocinas são controversos. Além disso, os estudos dessas
13 variantes foram realizados em populações caucasianas e asiáticas, geneticamente
14 mais homogêneas que a população brasileira e, na sua maioria, sem o controle
15 estatístico de possíveis variáveis confundidoras em relação aos níveis de citocinas e
16 à atividade da doença.

17 Os resultados podem contribuir para a compreensão da
18 heterogeneidade clínica e apontar para biomarcadores relacionados com o
19 diagnóstico, atividade de doença e prognóstico que auxiliem no manejo mais
20 adequado dos pacientes com AR. Além disso, os dados podem apontar para o
21 desenvolvimento de possíveis estratégias terapêuticas.

22

1 3 OBJETIVOS

2 3.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar se as variantes genéticas -509 C>T (rs1800469) e +869 T>C
4 (rs1800470) do *TGFB1* e -592 C>A (rs1800872) do gene *IL10* estão associadas com
5 suscetibilidade e atividade da doença, presença de autoanticorpos e níveis de
6 citocinas em pacientes com AR.

7

8 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 9 • Comparar a frequência das variantes -509 C>T e +869 T>C do *TGFB1* e -592
10 C>A do gene *IL10* em pacientes com AR e indivíduos controles;
- 11 • Associar estas variantes dos genes *IL-10* e do *TGFB1*, individualmente ou em
12 haplótipos do *TGFB1*, com a susceptibilidade à AR;
- 13 • Verificar a associação entre os diferentes genótipos e os níveis de citocinas em
14 pacientes com AR e indivíduos controles;
- 15 • Associar os genótipos das variantes citadas com a atividade de doença
16 determinada pelo DAS28;
- 17 • Determinar se há associação entre os genótipos e a presença de autoanticorpos
18 relacionados com prognóstico da doença (FR e anti-CCP) em pacientes com AR.

19

1 4 METODOLOGIA

2 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

3 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
4 Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) sob o parecer de
5 aprovação número CAAE: 06405812.1.0000.5231 (ANEXO A). Os indivíduos foram
6 convidados a participar voluntariamente da pesquisa, informados sobre o estudo e
7 assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

8 4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

9 Trata-se de um estudo caso-controle com 430 participantes, de ambos
10 os sexos, com idade entre 18 a 70 anos. Foram selecionados 262 pacientes com
11 diagnóstico de AR, atendidos no ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de
12 Especialidades do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, e 168 indivíduos
13 saudáveis doadores de sangue atendidos pelo Hemocentro Regional de Londrina,
14 para constituírem o grupo controle. Foram considerados critérios de exclusão:
15 presença de outras doenças autoimunes e inflamatórias, doenças infecciosas agudas
16 e/ou crônicas e neoplasias. Nenhum dos participantes do estudo apresentou doenças
17 cardíacas, tireoidianas, hepáticas, gastrointestinais ou oncológicas nem infecção
18 clinicamente evidente.

19 O diagnóstico de AR foi realizado a partir dos critérios do ACR/EULAR de
20 2010 (ALETAHA, 2010) e a atividade da doença foi determinada pelo escore DAS28
21 utilizando a PCR (APÊNDICE B). Os pacientes foram classificados em dois diferentes
22 grupos de acordo com a atividade da doença: remissão/mínima ($DAS28 < 3,2$) e
23 moderada/grave ($DAS28 \geq 3,2$) (ANDERSON et al., 2012).

24 Informações sobre o histórico médico, tratamento para a AR e o estilo
25 de vida foram obtidas na avaliação clínica realizada pelo médico reumatologista
26 utilizando um questionário de avaliação (APÊNDICE C). O peso corporal foi avaliado
27 com aproximação de 0,1 kg utilizando uma balança eletrônica e com os indivíduos
28 vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da manhã; a altura foi medida com

1 precisão de 0,1 cm, utilizando-se um estadiômetro. O IMC foi calculado como peso
2 (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado.

3 4.3 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

4 Após jejum de 12 horas, os indivíduos (pacientes e controles) foram
5 submetidos à coleta de sangue venoso sem coagulante ou contendo o anticoagulante
6 ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 10 mL e 20 mL, respectivamente. O material
7 foi centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos e alíquotas do soro, plasma e *buffy-coat*
8 foram armazenadas a -80°C até o momento das análises quando as amostras não
9 eram analisadas no mesmo dia.

10 4.4 MARCADORES IMUNOLÓGICOS

11 Os níveis de anti-CCP foram determinados por imunoensaio por
12 micropartículas por quimioluminescência (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park,
13 IL, EUA). Os níveis séricos de PCR sérica de alta sensibilidade e de FR foram
14 avaliados por turbidimetria (C800, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, EUA). A VHS foi
15 obtida por um método automatizado (Ves-Matic CUBE 30, DIESSE, Siena, Itália). De
16 acordo com as instruções dos fabricantes, FR e anti-CCP foram considerados
17 positivos quando os valores eram ≥ 30 U/mL e ≥ 5 U/mL, respectivamente. FR e anti-
18 CCP positivo alto foram considerados quando os valores encontrados foram
19 superiores a três vezes o limite superior da normalidade (ALETAHA et al. 2010). Os
20 níveis de TGF- β 1 e IL-10 foram determinados por imunofluorimetria em microesferas
21 magnéticas utilizando *kits* comerciais (ProcartaPlex by Thermo Fisher Scientific,
22 Vienna, Austria) para o equipamento MAGPIX® (*Luminex Corporation, Austin, TX,*
23 *USA*).

24 4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

25 Uma SNV na região promotora do gene *IL 10* localizado no cromossomo
26 1 foi genotipada: -592 A>C (rs1800872) na posição 206773062 e dois SNVs na região
27 reguladora do gene *TGFB1* localizado no cromossomo 19 foram genotipadas: +869
28 T>C or c.+29 T>C (rs1800470) na posição 41353016 e -509 C>T ou -1347 C>T
29 (rs1800469) na posição 41354391, de acordo com o listado no banco de dados

1 internacional. A extração do DNA genômico a partir do *buffy-coat* de células do sangue
2 periférico de ambos os grupos foi realizada utilizando o método de separação em
3 coluna com reagentes comercialmente disponíveis (Biopur, Biometrix Diagnóstica,
4 Curitiba, PR, Brasil), segundo as instruções do fabricante e o material armazenado a
5 -20°C até o uso. As amostras de DNA foram quantificadas utilizando o
6 espectrofotômetro NanoDrop 2000c™ (*ThermoScientific, Waltman, MA, USA*) a 260
7 nm e a pureza foi avaliada pela razão 260/280 nm.

8 4.6 VARIANTES -509 C>T (RS1800469) E +869 T>C (RS1800470) DO GENE *TGFB1*

9 As variantes +869 T>C (rs1800470) e -509 C>T (rs1800469) do gene
10 *TGFB1* foram avaliadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)
11 pelo método de TaqMan®. Foram utilizados ensaios validados (C__22272997_10 e
12 C__8708473_10, respectivamente) para determinação dos possíveis genótipos. O
13 ensaio foi realizado utilizando 0,25 µL de *Taqman SNP Genotyping Assay 40X*
14 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) contendo dois *primers* e duas sondas
15 TaqMan® MGB alelo-específicas com um corante repórter na extremidade 5' (VIC®
16 ou FAM®), 5 µL de *TaqMan Universal Genotyping Master Mix* (*Applied Biosystems,*
17 *Foster City, CA, USA*) e 5 ng de DNA genômico. Os níveis de fluorescência foram
18 avaliados pelo termociclador Step One (*Applied Biosystems da Life Techonologies,*
19 *Carlsbad, CA, USA*).

20 4.7 VARIANTE -592 C>A (RS1800872) DO GENE *IL10*

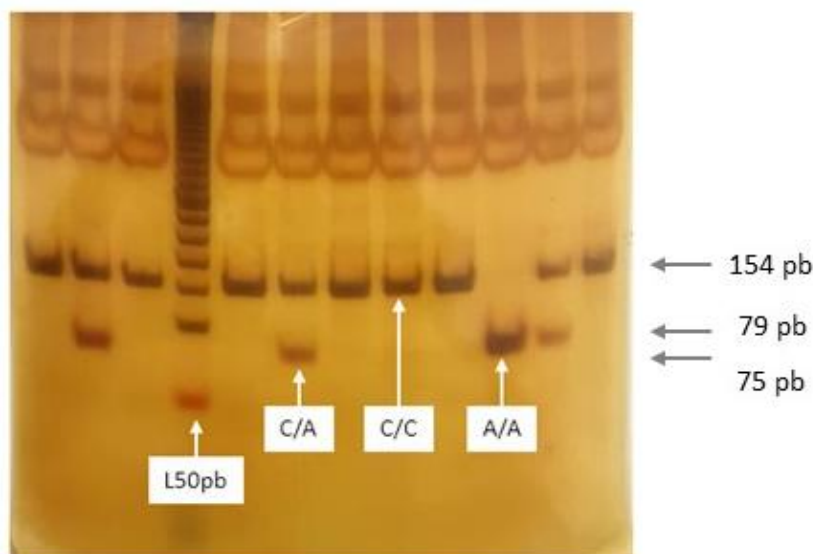
21 Foram utilizados aproximadamente 100 ng de DNA para amplificar a
22 variante -592 C>A do gene *IL10* utilizando *primers* sintetizados de acordo com a
23 sequência depositada no *GenBank* sob número de acesso: NG_012088.1. O *primer*
24 *forward* é formado pela sequência 5´GTG GAA ACA TGT GCC TGA GA 3´ e o *primer*
25 *reverse* é formado pela sequência 5´ATG AGG GGG TGG GCT AAA TA 3´. Após a
26 amplificação de uma sequência de 154 pares de base (pb) do gene *IL10*, o mesmo foi
27 submetido à digestão com a enzima de restrição *RsaI* (*Anza™, Invitrogen, Life*
28 *Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Os produtos da digestão foram analisados
29 segundo o polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição, do inglês
30 *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) pela eletroforese em gel de

1 poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata (Figura 6). O alelo A foi definido com
 2 fragmentos de 79 e 75 pb, enquanto o alelo C não sofre clivagem permanecendo com
 3 154 pb (CAPASSO, et. al., 2007).

4

5 **Figura 9** – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, para caracterização dos
 6 genótipos da variante -592 C>A do gene *IL10*.

7



8

9 pb: pares de base; L50 pb: Ladder 50 pb; A: fragmentos de 79 pb e 75 pb; C: fragmento de
 10 154 pb;

11 **Fonte:** o próprio autor.

12

13

14 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

15

16 As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2) e
 17 os resultados expressos em número absoluto (n) e percentual (%). Variáveis
 18 contínuas foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney e os resultados expressos
 19 como mediana e percentis (25-75%). A análise de regressão logística binária ou
 20 multinomial foi realizada para avaliar o efeito das variantes genéticas no grupo de
 21 estudo e foram determinados *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95%.
 22 Os valores de p foram ajustados para variáveis confundidoras. O equilíbrio de Hardy-
 23 Weinberg, a estimativa do desequilíbrio de ligação por pares e a análise do haplótipo
 24 *TGFB1* foram realizadas no programa SNPStats (SOLÉ et al. 2006). O desequilíbrio
 de ligação por pares entre os SNVs foi fornecido descrevendo os valores de D' e o r^2 .

1 A análise estatística foi realizada com SPSS para Windows, versão 24.0 (SPSS 31
2 Inc., CHIGADO, IL, EUA) e SNPStats. A significância estatística foi definida como
3 $p < 0,05$.

4

1 5 RESULTADOS

2 Os resultados desta tese foram apresentados e discutidos em dois artigos
3 científicos:

4 Artigo 1: ***TGFB1* (rs1800470 and rs1800469) variants are independently**
5 **associated with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis**
6 **patients.** Submetido ao periódico Clinical and Experimental Medicine, Fator de
7 impacto: 2,644, Qualis B1.

8 Artigo 2: **Involvement of *IL10* (rs1800782) variant with autoantibody in**
9 **rheumatoid arthritis patients.** Submetido ao periódico Clinical Rheumatology como
10 Brief Report, Fator de impacto: 2,441, Qualis B1.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

1 5.1 ARTIGO 1

2 ***TGFBI* (rs1800470 and rs1800469) variants are independently associated with disease**
3 **activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis patients**

4

5 Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda^{1,2}, Tamires Flauzino², Neide Tomimura Costa³, Marcell
6 Alysson Batisti Lozovoy^{2,4}, Edna Maria Vissoci Reiche^{2,4}, Andréa Name Colado Simão^{2,4}.

7

8 1 Department of Rheumatology, Pontifical Catholic University of Paraná, Londrina, PR,
9 Brazil10 2 Laboratory of Research in Applied Immunology, Health Sciences Center, State University
11 of Londrina, Londrina, PR, Brazil

12 3 Department of Rheumatology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

13 4 Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State
14 University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

15

16

17 * Corresponding author: Andréa Name Colado Simão. Postal address:
18 Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center,
19 University Hospital, State University of Londrina, Av. Robert Koch 60, Londrina, Paraná,
20 Brazil. CEP: 86038-440. Tel/Fax: +55-43-3371-2619.

21

22

23

24

25

1

2 **Abstract**

3 **Objective:** To evaluate the association between *TGFBI* +869 T>C (rs1800470) and *TGFBI* -
4 509 C>T (rs1800469) variants with susceptibility for rheumatoid arthritis (RA), disease
5 activity, presence of rheumatoid factor (RF), anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) and
6 TGF- β 1 plasma levels. **Subjects and Methods:** A total of 262 patients with RA and 168 control
7 individuals were tested for the *TGFBI* variants using a TaqMan genotyping assay. **Results:**
8 The *TGFBI* +869 T>C and -509 C>T variants, independently or in haplotype combination,
9 were not associated with RA's susceptibility. Patients with the *TGFBI* -509 TT genotype had
10 a higher frequency of moderate/severe disease activity (OR 2.58, 95% CI 1.04–6.42, $p=0.041$).
11 The genetic variants were not associated with TGF- β 1 plasma levels in the overall RA group.
12 However, the *TGFBI* +869 CC genotype in seropositive patients for RF or anti-CCP was
13 associated with decreased TGF- β 1 levels ($p=0.032$ and $p=0.039$, respectively). Patients with
14 the *TGFBI* +869 C allele and elevated RF titles demonstrated a higher frequency of
15 moderate/severe disease activity ($p=0.037$) than patients with the T allele. **Conclusion:** The
16 *TGFBI* +869 T>C variant was associated with diminished TGF- β 1 plasma levels and
17 moderate/severe activity disease only in seropositive RF patients. This is the first study showing
18 that TGF- β 1 plasma levels can be modulated by the interaction between the *TGFBI* +869 T>C
19 variant and autoantibodies. However, the *TGFBI* -509 C>T variant was associated with
20 moderate/severe activity disease, independently of autoantibodies positivity. Thus, our findings
21 suggest that *TGFBI* +869 T>C and -509 C>T variants can predict activity disease in different
22 RA patient subgroups.

23

24 **Keywords:** Rheumatoid arthritis; Genetic variants; Transforming growth factor- β 1; rs1800470;

1 1800469.

2 **Introduction**

3 Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic chronic inflammatory disease characterized by
4 the presence of persistent inflammatory synovitis, which generally symmetrically involves
5 peripheral joints along with extra-articular and systemic manifestations [1]. Although the
6 precise etiology has not been established yet, it is known that environmental factors, such as
7 smoking and infections, may cause the malfunction of the immune system in genetically
8 predisposed individuals, leading to RA development [2]. Rheumatoid factor (RF) and anti-
9 citrullinated protein antibodies (ACPA) are the two remarkable autoantibodies in RA and
10 defines the seropositive form of RA, which constitutes approximately two-thirds of cases [3].
11 They can precede the onset of symptoms and predict a more severe disease course, indicating
12 a pathogenic role in RA [4–6].

13 Chronic inflammation in RA is supported by the induction of autoimmunity and the
14 imbalance between inflammatory and regulatory pathways, characterized by enhanced Th1 and
15 Th17 response and a defective Th2 and regulatory T (Treg) response [7]. Treg cells modulate
16 immune responses and ‘maintain immunologic tolerance, either by the cytokines production of
17 interleukin (IL)-10 and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) and also through inhibiting
18 effector T cell proliferation [8,9]. TGF- β 1 suppresses lymphocyte proliferation and
19 differentiation, preventing inappropriate autoimmune responses [10]. Defects in Treg function
20 or reduced numbers have been put forward due to decreased TGF- β 1 plasma levels in RA
21 patients [7].

22 Since cytokine levels expression assumes to be predominantly under genetic control,
23 different single nucleotide variants (SNVs) may play an important role in the susceptibility,
24 bone, and cartilage destruction and could affect the course of RA [11]. The *TGFBI* (rs1800470

1 and rs1800469) variants have been associated with a risk for developing several autoimmune
2 diseases, including RA [12,13]. The *TGFBI* gene locates in on chromosome 19q13.2 region.
3 The *TGFBI* +869 T>C (rs1800470) variant may affect the function in the signal peptide
4 sequence, perhaps influencing the intracellular trafficking of the TGF- β 1 pre-proprotein [14].
5 The *TGFBI* +869 CC genotype was associated with elevated TGF- β 1 levels in RA patients
6 [15]. The *TGFBI* -509 C>T (rs1800469) variant locates in the first negative regulatory region,
7 and the T allele was associated with elevated TGF- β 1 levels due to the loss of negative
8 regulation [16]. The TT genotype was associated with increased gene expression of TGF- β 1 in
9 comparison to the CC genotype [17,18]. The role of these variants on RA susceptibility is
10 unclear, and the data are scarce and contradictory [12,13].

11 RA is a heterogeneous disease, and the identification of genetic biomarkers related to
12 earlier diagnosis, prognosis, and therapeutic targeting is currently an active research area.
13 Therefore, the present study aimed to evaluate the association between *TGFBI* +869 T>C
14 (rs1800470) and *TGFBI* -509 C>T (rs1800469) variants with the RA's susceptibility, disease
15 activity, presence of autoantibodies, and cytokines plasma levels in RA patients from Southern
16 Brazilian population.

17 **Subjects and Methods**

18 The study included 430 subjects: 168 healthy individuals (control group) selected
19 among blood donors of the University Hospital and 262 patients with RA selected from the
20 Rheumatology Outpatient of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. RA patients
21 were diagnosed according to the 2010 RA classification criteria [19]. Information about
22 lifestyle and medical history was obtained at clinical evaluation. The ethnicity was self-reported
23 as Caucasian and non-Caucasian (Asian, Black, and Afro-Brazilian). None of the participants

1 in the study presented heart, thyroid, hepatic, gastrointestinal, or oncological diseases and none
2 had a clinically evident infection.

3 Disease activity status was determined using Disease Activity Score (DAS) in 28 joints
4 based on C-reactive protein (CRP). According to DAS28 values patients can be classified into
5 two groups of disease activity: remission/mild ($\text{DAS28} < 3.2$) and moderate/severe ($\text{DAS28} \geq$
6 3.2) [20]. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

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

11 *Blood Collection and Immunological Biomarkers*

12 Venous blood samples were obtained after fasting for 12 hours with
13 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant and without anticoagulant. The
14 samples had centrifuged at 2,500 rpm for 15 min. Further, plasma, serum, and buffy-coat
15 aliquots were stored at -80°C when the analyzes had not been processed on the same day. Anti-
16 cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody determined by chemiluminescence
17 microparticle immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Serum high
18 sensitivity CRP and RF were measured using a turbidimetric assay (C8000, Abbott Laboratory,
19 Abbott Park, IL, USA). According to the manufacturer's instructions, RF and anti-CCP were
20 positive when the values were ≥ 30 U/mL and ≥ 5 U/mL, respectively. High positive RF and
21 anti-CCP were considered when the values found were more than three times the upper limit of
22 normality [19]. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was obtained by an automated kinetic-
23 photometric method (Ves-Matic CUBE 30, DIESSE, Siena, Italy).

1 TGF- β 1 plasma levels were determined using microspheres immunofluorometric assay
2 (ProcartaPlex by Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria) for the Luminex platform
3 (MAGPIX™, Luminex Corp., Austin, TX, USA).

4 *TGFBI* genetic variants genotyping

5 Two SNVs in the regulatory region of the *TGFBI* gene located on chromosome 19 were
6 genotyped: +869 T>C or c.+29T>C (rs1800470) at position 41353016 and -509 C>T or -1347
7 C>T (rs1800469) at position 41354391, according to listed in the international database.
8 Genomic DNA was extracted from a buffy coat of peripheral blood cells using a resin column
9 procedure (Biopur, Biometrix Diagnostika, Curitiba, Brazil), following the manufacturer's
10 recommendations and stored a -20°C until use. DNA concentration was measured at 260 nm
11 using a NanoDrop 2000c™ spectrophotometer (ThermoScientific, Waltman, MA, USA).

12 The rs1800469 and rs1800470 *TGFBI* variants were genotyped by TaqMan allelic
13 discrimination assay on real-time polymerase chain reaction (qPCR) using allele-specific
14 fluorogenic oligonucleotide probes (C__22272997_10 and C__8708473_10, respectively). The
15 reaction performed using 0.25 μ L TaqMan SNP Genotyping Assay 40x (Applied Biosystems,
16 Foster City, CA, USA). It was added two sequence-specific primers and two allele-specific
17 TaqMan® MGB probes with a reporter dye at its 5' end (VIC® or FAM™), five μ L TaqMan
18 Universal Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and five ng
19 of genomic DNA.

20 *Statistical analysis*

21 Categorical data evaluated by the chi-square (χ^2) test and expressed as absolute number
22 (n) and percentage (%). Continuous data evaluated by the Mann-Whitney test and expressed as
23 median and percentile range (25%–75%). The p value was adjusted for extraneous variables by
24 binary logistic regression analysis. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI)

1 were calculated. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), the estimation of pairwise linkage
2 disequilibrium (LD), and *TGFBI* haplotype analysis performed in the SNPStats program [21].
3 LD between the specified SNVs was provided by describing D' and r^2 value. All statistical
4 analyzes were performed with SPSS for Windows, version 24.0 (SPSS 31 Inc., CHICAGO, IL,
5 USA) and the SNPStats program. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

6 **Results**

7 Table 1 shows socio-demographic, clinical, and laboratory data in RA patients and
8 controls. Patients and controls did not differ in sex ($p = 0.419$) and ethnicity ($p = 0.159$). We found
9 that RA patients were older ($p < 0.001$) and had a higher BMI ($p < 0.001$) than controls. The
10 groups did not differ regarding smoking ($p = 0.101$). Thus, we have adjusted the results for
11 possible effects of age, sex, ethnicity, and BMI in multivariate analyses. The median disease
12 duration was ten years (4–19) and 135 (53.1%) patients were in moderate/severe disease activity
13 evaluated by $DAS28 \geq 3.2$. The cytokine levels differed significantly between groups, with
14 diminished TGF- β 1 levels in the RA group.

15 Table 2 shows the distribution of genotypes and allele frequencies of *TGFBI* +869 T>C
16 and *TGFBI* -509 C>T variants between RA and controls patients. In the two SNVs evaluated,
17 the genotypes' frequency in codominant, dominant, and recessive genetic models did not differ
18 between RA patients and controls ($p > 0.05$). No significant associations were found in the allele
19 frequencies as well. All the analyses in table 2 were adjusted by age, sex, and ethnicity. The
20 genotype distribution of *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T variants were consistent with
21 those expected from the HWE ($p > 0.05$) in both groups (patients and controls).

22 Four possible haplotype combinations with *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T
23 variants were investigated in our study: T/C, C/T, C/C, and T/T. The LD between *TGFBI*
24 rs1800470 and rs1800469 was $D' = 0.986$ and $r^2 = 0.806$. In our patient cohort, the predominant

1 haplotype was T/C (55%), while the less frequent haplotype was T/T (rare, <1%). The
2 distribution of *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T haplotypes did not differ among RA
3 patients and controls (Table 3).

4 In the present study, we evaluated whether *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T
5 variants could interfere in disease activity, laboratory biomarkers, and TGF- β 1 plasma levels
6 in RA patients (Table 4). Regarding *TGFBI* +869 T>C variant, we did not find an association
7 between this variant and autoantibodies status, disease activity, ESR, and CRP and TGF- β 1
8 level in the overall RA group. Besides, when we analyzed the *TGFBI* -509 C>T variant, we
9 found that patients with the TT genotype had a higher frequency of patients with
10 moderate/severe disease activity ($\text{DAS28} \geq 3.2$) than those with the CC genotype [OR 2.58
11 (1.04–6.42), $p=0.041$] after adjusted by age, sex, ethnicity, BMI and treatment. However,
12 autoantibodies status, ESR, CRP, and TGF- β 1 levels were not associated with *TGFBI* -509
13 C>T variant in RA patients. Disease duration and treatment also did not differ between the
14 study groups. We also observed that these two variants did not interfere in ESR, CRP, and
15 cytokine plasma levels in health control (data not shown).

16 Further, we evaluated whether *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T variants could
17 have a differential effect on TGF- β 1 levels in patients with positivity for RF or anti-CCP.
18 Patients with positive RF and *TGFBI* +869 CC genotype had lower TGF- β 1 plasma levels than
19 those with the TT+TC genotype (Figure 1A). Besides, patients with positive anti-CCP and the
20 *TGFBI* +869 CC genotype had lower TGF- β 1 plasma levels than those with the TT+TC
21 genotype (Figure 1B). On the other hand, TGF- β 1 plasma levels did not differ between *TGFBI*
22 +869 genotypes in RA patients with the absence of RF and anti-CCP. Besides that, patients
23 with high RF (>90 U/mL) and the *TGFBI* +869 TC+CC genotypes showed a high frequency
24 of patients with $\text{DAS28} \geq 3.2$ ($p=0.037$) (Figure 1C). However, no differences were observed
25 between disease activity and *TGFBI* +869 genotypes in patients with high anti-CCP

1 (>15U/mL) (Figure 1D). All the results in figure 1 were adjusted by age, sex, ethnicity, BMI,
2 and treatment. No differences were observed between *TGFBI* -509 C>T variant and TGF- β 1
3 levels in patients with positivity for RF or anti-CCP (data not shown).

4 **Discussion**

5 The main findings of the present study are that the *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509
6 C>T variants, individually or in haplotype combination, were not associated with RA
7 susceptibility. Although these genetic variants were not directly associated with the cytokine
8 plasma levels, the presence of the *TGFBI* +869 CC genotype in seropositive patients for RF or
9 anti-CCP was associated with lower TGF- β 1 plasma levels. Besides that, patients with *TGFBI*
10 +869 C allele (TC+CC genotypes) and high RF titles demonstrated a higher frequency of
11 moderate/severe disease activity than those with the T allele. The *TGFBI* -509 TT genotype
12 had a higher frequency of patients with moderate/severe disease activity.

13 In the present study, we demonstrated that RA patients had lower TGF- β 1 plasma levels
14 than controls, in agreement with previous studies [22,23]. TGF- β 1 is a Treg cytokine with
15 immunosuppressive and anti-inflammatory properties [24]. Thus, it has been proposed that a
16 reduction of circulating TGF- β 1 levels may predispose autoimmune diseases [25–27].
17 Considering that, we investigated if the *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T variants could
18 be involved in TGF- β 1 plasma level reduction and RA's susceptibility. Our data showed that
19 the *TGFBI* +869 T>C variant was not associated with RA's susceptibility and TGF- β 1 plasma
20 level in the overall RA group. Our data agree with previous studies that find no association with
21 RA susceptibility [28–32]. Otherwise, some studies have shown an association between the TT
22 genotype and T allele with susceptibility to RA [15,33,34] as well as the protective role of the
23 CC genotype [12,35,36]. Meta-analysis performed by Lee and Bae [13] demonstrated that the
24 *TGFBI* +869 T allele was associated with RA's susceptibility in Asians and Arabs but not
25 Europeans. Besides, unlike our findings, a previous study observed that the *TGFBI* +869 CC

1 genotype was associated with higher levels of TGF- β 1 in RA patients than controls in a non-
2 caucasian sample from Egypt [15]. These discrepancies may be due to the distinct miscegenated
3 Brazilian population, once ethnicity influences the frequency of the genetic variants in different
4 populations, a clear sign of the disease's genetic heterogeneity [37].

5 Interestingly, our data demonstrated that the presence of the *TGFBI* +869 CC genotype
6 was independently associated with diminished TGF- β 1 plasma levels only in seropositive
7 patients for RF or anti-CCP but not in the absence of those autoantibodies. These findings are
8 corroborated by Ceccarelli et al. [38], who observed that RA patients with *TGFBI* +869 T allele
9 and positive RF or anti-CCP had less erosion scores assessed by ultrasound [38]. Two
10 hypotheses may explain the association between TGF- β 1 and autoantibodies. First, TGF- β 1
11 regulates B cell proliferation and survival, inhibiting immunoglobulin synthesis, and isotype
12 exchange. Thus, reduced TGF- β 1 plasma levels may increase B cell survival and expansion
13 and, consequently, favor antibodies' production [10,24]. Second, the inflammatory cytokine
14 microenvironment mediated by autoantibodies may favor the enhancement of Th17 cells in the
15 presence of IL-6, with inhibition of Treg differentiation, leading to lower TGF- β 1 levels [7].
16 However, we demonstrated TGF- β 1 reduction only in patients with CC genotype. This is the
17 first study to suggest the interaction between *TGFBI* +869 T>C variant and autoantibodies in
18 the modulation of TGF- β 1 levels, independently of disease activity and other confounding
19 factors

20 In addition, we also demonstrated that patients with the *TGFBI* +869 C allele and
21 elevated RF titles had a higher frequency of moderate/severe disease activity than the TT
22 genotype. Altogether, our results suggested that TGF- β 1 reduction could be involved in that
23 association. However, we failed to demonstrate an association between disease activity and
24 *TGFBI* +869 T>C genotypes in patients with high anti-CCP. Some considerations regarding
25 these findings. First, not all anti-CCP seem to be equally detrimental in RA since differences in

1 the glycosylation pattern of the constant region of the antibody (responsible for the antibody's
2 effector function) can significantly change the antibody's biological effects, and so, account for
3 pathogenicity [39,40]. Secondly, the nature of the antigens and different activation conditions
4 for which B cells determine the production of RF and anti-CCP [41]. Moreover, it seems that
5 antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity than
6 antibodies against cyclic citrullinated peptides [42]. More studies are necessary to elucidate the
7 genetic and immunologic mechanisms involved in those associations.

8 Regarding the *TGFBI* -509 C>T variant, we did not find an association between that
9 variant and RA susceptibility and TGF- β 1 plasma levels, in agreement with other studies
10 [28,32,43]. However, we observed that *TGFBI* -509 TT genotype had a higher frequency of
11 patients with moderate/severe disease activity than those with CC and CT genotype. Although
12 no previous studies have evaluated this variant with DAS28, there is an almost linear
13 relationship between disease activity and radiologic damage progression [44–46]. Regular
14 disease activity assessment drives therapeutic changes, and sustained remission or low disease
15 activity is the ultimate treatment goal [47,48]. Our data reinforce the findings of Kim et al. [32]
16 that demonstrated a positive correlation between the *TGFBI* -509 TT and CT genotypes with
17 the radiographic progression and disease duration. Furthermore, we evaluated the haplotypes
18 of the *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T variants. Genetic variants do not exert
19 significant influence by itself [49], and the haplotype analysis may be a more robust method to
20 reveal the association between SNVs and disease susceptibility [50]. Our data is in agreement
21 with previous studies that failed to demonstrate association among these *TGFBI* haplotypes,
22 RA susceptibility, and TGF- β 1 plasma levels (data not shown) [32,43].

23 The inconsistent results observed on reported studies between *TGFBI* +869 T>C and
24 *TGFBI* -509 C>T variants with TGF- β 1 levels and disease activity may be explained by design
25 study, ethnicity, sample size, and in the execution of the genotyping methods. Many studies

1 did not describe BMI and the need for controlling extraneous variables, particularly ethnicity,
2 age, and BMI. Therefore, our study combines a multivariate statistical approach, allowing
3 controlling for many possible confounding variables, with the inclusion of a larger number of
4 participants and controls, which were recruited in the same catchment area. However, some
5 limitations of this study should be considered. First, this is a case-control design, which does
6 not allow inferences on a causal relationship. Second, the ethnicity of the subjects was self-
7 reported. Third, the study design was based on a single basal cytokine's measurement and
8 specific SNVs determination, which precludes the assessment of how other factors may impact
9 on the complex relationship between genotype, cytokine levels, and disease activity. To our
10 knowledge, this is the first study to investigate the relationship between these variants in RA
11 patients from the Brazilian population.

12 In conclusion, we demonstrated that the *TGFBI* +869 T>C variant was associated with
13 diminished TGF- β 1 plasma levels and moderate/severe activity disease only in seropositivity
14 RF patients. Therefore, this is the first study showing that TGF- β 1 plasma levels can be
15 modulated by the interaction between *TGFBI* +869 T>C variant and autoantibodies. However,
16 the *TGFBI* -509 C>T variant was associated with moderate/severe activity disease,
17 independently of autoantibodies positivity. Thus, our findings suggested that *TGFBI* +869 T>C
18 and *TGFBI* -509 C>T variants could be used to predict a worse prognosis in different RA
19 patient subgroups.

20

21 **Acknowledgements:** The study was supported by grants from Coordination for the
22 Improvement of Higher Level of Education Personnel (CAPES) and Institutional Program for
23 Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and
24 Technological Development (CNPq).

1 **Author's contribution:** Conception and research design: ANCS, TF; Manuscript writing and
2 discussion of results: ANCS, EMVR, TMVI, TF; Data collection: TF, TMVI, NTC; Laboratory
3 analysis: TF, MABL; Statistical analysis: ANCS, TF. All authors have read and approved the final
4 manuscript.

5 **Compliance with ethical standards**

6 **Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

7 **Ethical approval:** This study was conducted after approval by the Institutional Research Ethics
8 Committees of University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 06405812.1.0000.5231). All
9 procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the
10 ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964
11 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards

12 **Informed consent:** All the participants included in this study provided written informed
13 consent.

14

15 **References**

- 16 [1] S. Mateen, A. Zafar, S. Moin, A.Q. Khan, S. Zubair, Understanding the role of cytokines in the
17 pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Clin. Chim. Acta.* 455 (2016) 161–171.
18 <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.02.010>.
- 19 [2] Q. Guo, Y. Wang, D. Xu, J. Nossent, N.J. Pavlos, J. Xu, Rheumatoid arthritis: pathological
20 mechanisms and modern pharmacologic therapies, *Bone Res.* 6 (2018) 15.
21 <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0016-9>.
- 22 [3] V. Malmström, A.I. Catrina, L. Klareskog, The immunopathogenesis of seropositive
23 rheumatoid arthritis: from triggering to targeting, *Nat. Rev. Immunol.* 17 (2017) 60–75.
24 <https://doi.org/10.1038/nri.2016.124>.

- 1 [4] F. Ingegnoli, R. Castelli, R. Gualtierotti, Rheumatoid factors: clinical applications., *Dis.*
2 *Markers.* 35 (2013) 727–34. <https://doi.org/10.1155/2013/726598>.
- 3 [5] S. Rantapää-Dahlqvist, B.A.W. de Jong, E. Berglin, G. Hallmans, G. Wadell, H. Stenlund, U.
4 Sundin, W.J. van Venrooij, Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid
5 factor predict the development of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 2741–2749.
6 <https://doi.org/10.1002/art.11223>.
- 7 [6] J. Sokolove, X. Zhao, P.E. Chandra, W.H. Robinson, Immune complexes containing
8 citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fc γ receptor,
9 *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 53–62. <https://doi.org/10.1002/art.30081>.
- 10 [7] Q. Niu, B. Cai, Z. Huang, Y. Shi, L. Wang, Disturbed Th17/Treg balance in patients with
11 rheumatoid arthritis, *Rheumatol. Int.* 32 (2012) 2731–2736. [https://doi.org/10.1007/s00296-](https://doi.org/10.1007/s00296-011-1984-x)
12 [011-1984-x](https://doi.org/10.1007/s00296-011-1984-x).
- 13 [8] S. Sakaguchi, Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in
14 immunological tolerance to self and non-self, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 345–352.
15 <https://doi.org/10.1038/ni1178>.
- 16 [9] S.G. Zheng, J. Wang, P. Wang, J.D. Gray, D.A. Horwitz, IL-2 Is Essential for TGF- β to
17 Convert Naive CD4 + CD25 – Cells to CD25 + Foxp3 + Regulatory T Cells and for Expansion
18 of These Cells, *J. Immunol.* 178 (2007) 2018–2027.
19 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2018>.
- 20 [10] M.O. Li, Y.Y. Wan, S. Sanjabi, A.-K.L. Robertson, R.A. Flavell, TRANSFORMING
21 GROWTH FACTOR- β REGULATION OF IMMUNE RESPONSES, *Annu. Rev. Immunol.*
22 24 (2006) 99–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>.
- 23 [11] A. Paradowska-Gorycka, J. Trefler, J. Maciejewska-Stelmach, J.K. Łacki, Interleukin-10 gene
24 promoter polymorphism in Polish rheumatoid arthritis patients, *Int. J. Immunogenet.* 37 (2010)
25 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00913.x>.
- 26 [12] T.-B. Zhou, H.-L. Zhao, S.-L. Fang, G.P.C. Drummen, Association of transforming growth
27 factor- β 1 T869C, G915C, and C509T gene polymorphisms with rheumatoid arthritis risk, *J.*
28 *Recept. Signal Transduct.* 34 (2014) 469–475. <https://doi.org/10.3109/10799893.2014.919594>.
- 29 [13] Y.H. Lee, S.-C. Bae, Association between circulating transforming growth factor- β 1 level and
30 polymorphisms in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A meta-analysis.,
31 *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand).* 63 (2017) 53–59.
32 <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.1.11>.
- 33 [14] Y. Yamada, H. Okuizumi, A. Miyauchi, Y. Takagi, K. Ikeda, A. Harada, Association of

- 1 transforming growth factor β 1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women, *Arthritis*
2 *Rheum.* 43 (2000) 452. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200002\)43:2<452::AID-](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200002)43:2<452::AID-)
3 [ANR28>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200002)43:2<452::AID-ANR28>3.0.CO;2-C).
- 4 [15] Y.M. Hussein, R.H. Mohamed, E.E. El-Shahawy, S.S. Alzahrani, Interaction between TGF- β 1
5 (869C/T) polymorphism and biochemical risk factor for prediction of disease progression in
6 rheumatoid arthritis, *Gene.* 536 (2014) 393–397. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.042>.
- 7 [16] R. Shah, B. Rahaman, C.K. Hurley, P.E. Posch, Allelic diversity in the TGFB1 regulatory
8 region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms, *Hum. Genet.* 119
9 (2006) 61–74. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-0112-y>.
- 10 [17] H. Cao, Q. Zhou, R. Lan, O.D. Røe, X. Chen, Y. Chen, D. Wang, A Functional Polymorphism
11 C-509T in TGF β -1 Promoter Contributes to Susceptibility and Prognosis of Lone Atrial
12 Fibrillation in Chinese Population, *PLoS One.* 9 (2014) e112912.
13 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112912>.
- 14 [18] W. Guo, Z. Dong, Y. Guo, Z. Chen, Z. Yang, G. Kuang, B. Shan, Polymorphisms of
15 transforming growth factor- β 1 associated with increased risk of gastric cardia adenocarcinoma
16 in north China, *Int. J. Immunogenet.* 38 (2011) 215–224. <https://doi.org/10.1111/j.1744->
17 [313X.2010.00991.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00991.x).
- 18 [19] D. Aletaha, T. Neogi, A.J. Silman, J. Funovits, D.T. Felson, C.O. Bingham, N.S. Birnbaum,
19 G.R. Burmester, V.P. Bykerk, M.D. Cohen, B. Combe, K.H. Costenbader, M. Dougados, P.
20 Emery, G. Ferraccioli, J.M.W. Hazes, K. Hobbs, T.W.J. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T.K.
21 Kvien, T. Laing, P. Mease, H.A. Ménard, L.W. Moreland, R.L. Naden, T. Pincus, J.S. Smolen,
22 E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P.P. Tak, K.S. Upchurch, J. Vencovský, F. Wolfe, G.
23 Hawker, 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of
24 Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative, *Arthritis*
25 *Rheum.* 62 (2010) 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>.
- 26 [20] J. Anderson, L. Caplan, J. Yazdany, M.L. Robbins, T. Neogi, K. Michaud, K.G. Saag, J.R.
27 O’Dell, S. Kazi, Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of
28 Rheumatology recommendations for use in clinical practice., *Arthritis Care Res. (Hoboken).* 64
29 (2012) 640–7. <https://doi.org/10.1002/acr.21649>.
- 30 [21] X. Sole, E. Guino, J. Valls, R. Iniesta, V. Moreno, SNPStats: a web tool for the analysis of
31 association studies, *Bioinformatics.* 22 (2006) 1928–1929.
32 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>.
- 33 [22] B. de PAZ, M. ALPERI-LÓPEZ, F.J. BALLINA-GARCÍA, C. PRADO, C. GUTIÉRREZ, A.

- 1 SUÁREZ, Cytokines and Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Their Relationship
2 with Response to Corticosteroids, *J. Rheumatol.* 37 (2010) 2502–2510.
3 <https://doi.org/10.3899/jrheum.100324>.
- 4 [23] V. Hashemi, A.S. Farrokhi, A. Tanomand, Z. Babaloo, M. Hojjat-Farsangi, E. Anvari, M.-T.
5 Tahoori, R. Ezzeddini, A. Hosseini, T. Gharibi, G. Ghalamfarsa, F. Jadidi-Niaragh,
6 Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells and disease activity in
7 patients with rheumatoid arthritis in Iranian population, *Immunol. Lett.* 204 (2018) 16–22.
8 <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.001>.
- 9 [24] S. Sanjabi, S.A. Oh, M.O. Li, Regulation of the Immune Response by TGF- β : From
10 Conception to Autoimmunity and Infection, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9 (2017)
11 a022236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022236>.
- 12 [25] D.-Y. Chen, Y.-M. Chen, H.-H. Chen, C.-W. Hsieh, C. Lin, J.-L. Lan, The associations of
13 circulating CD4 + CD25 high regulatory T cells and TGF- β with disease activity and clinical
14 course in patients with adult-onset Still's disease, *Connect. Tissue Res.* 51 (2010) 370–377.
15 <https://doi.org/10.3109/03008200903461462>.
- 16 [26] T. Jin, K. Almehed, H. Carlsten, H. Forsblad-d'Elia, Decreased serum levels of TGF- β 1 are
17 associated with renal damage in female patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus.* 21
18 (2012) 310–318. <https://doi.org/10.1177/0961203311425528>.
- 19 [27] L. Zhang, J. Yan, Y.-X. Wang, Y. Wan, J. Li, P. Liu, B. Xu, B. Wang, W. Peng, F. Pan, J.
20 Wang, Association of TGF- β 1 +869C/T promoter polymorphism with susceptibility to
21 autoimmune diseases: a meta-analysis, *Mol. Biol. Rep.* 40 (2013) 4811–4817.
22 <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2577-4>.
- 23 [28] T. Kobayashi, A. Murasawa, S. Ito, K. Yamamoto, Y. Komatsu, A. Abe, T. Sumida, H. Yoshie,
24 Cytokine Gene Polymorphisms Associated With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis in
25 Japanese Adults, *J. Periodontol.* 80 (2009) 792–799. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.080573>.
- 26 [29] G. Alayli, N. Kara, B. Tander, F. Canturk, S. Gunes, H. Bagci, Association of transforming
27 growth factor β 1 gene polymorphism with rheumatoid arthritis in a Turkish population, *Jt.*
28 *Bone Spine.* 76 (2009) 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2008.02.012>.
- 29 [30] V.F. Panoulas, K.M.J. Douglas, J.P. Smith, A. Stavropoulos-Kalinoglou, G.S. Metsios, P.
30 Nightingale, G.D. Kitas, Transforming growth factor- 1 869T/C, but not interleukin-6 -174G/C,
31 polymorphism associates with hypertension in rheumatoid arthritis, *Rheumatology.* 48 (2008)
32 113–118. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken443>.
- 33 [31] V. Pokorny, Transforming growth factor 1 gene (HSTGFB1) nucleotide T869C (codon 10)

- 1 polymorphism is not associated with prevalence or severity of rheumatoid arthritis in a
2 Caucasian population, *Ann. Rheum. Dis.* 62 (2003) 907–908.
3 <https://doi.org/10.1136/ard.62.9.907>.
- 4 [32] S. Kim, S. Han, G. Kim, J. Lee, Y. Kang, TGF- β 1 polymorphism determines the progression of
5 joint damage in rheumatoid arthritis, *Scand. J. Rheumatol.* 33 (2004) 389–394.
6 <https://doi.org/10.1080/03009740410010344>.
- 7 [33] S.L. Patel, J. Prakash, V. Gupta, TGF- β 1 +869C/T polymorphism increases susceptibility to
8 rheumatoid arthritis in North Indian population, *Clin. Rheumatol.* 39 (2020) 2881–2888.
9 <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05064-w>.
- 10 [34] Y. Sugiura, Transforming growth factor beta1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis, *Ann.*
11 *Rheum. Dis.* 61 (2002) 826–828. <https://doi.org/10.1136/ard.61.9.826>.
- 12 [35] M.N. Saad, M.S. Mabrouk, A.M. Eldeib, O.G. Shaker, Genetic Case-Control Study for Eight
13 Polymorphisms Associated with Rheumatoid Arthritis, *PLoS One.* 10 (2015) e0131960.
14 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131960>.
- 15 [36] W. Sun, M. Yi, Y. Bai, L. Wu, J. Chen, Y. Ren, X. Liu, H. Wu, Y. Meng, Q. Zhang,
16 Correlations between the polymorphism of +869T/C in TGF- β 1 and rheumatoid arthritis., *J.*
17 *Musculoskelet. Neuronal Interact.* 19 (2019) 127–132.
18 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30839312>.
- 19 [37] K. Yamamoto, Y. Okada, A. Suzuki, Y. Kochi, Genetics of rheumatoid arthritis in Asia--
20 present and future., *Nat. Rev. Rheumatol.* 11 (2015) 375–9.
21 <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.7>.
- 22 [38] F. Ceccarelli, C. Perricone, M. Fabris, C. Alessandri, A. Iagnocco, C. Fabro, E. Pontarini, S.
23 De Vita, G. Valesini, Transforming growth factor β 869C/T and interleukin 6 -174G/C
24 polymorphisms relate to the severity and progression of bone-erosive damage detected by
25 ultrasound in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 13 (2011) R111.
26 <https://doi.org/10.1186/ar3396>.
- 27 [39] F. Coutant, Pathogenic effects of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis –
28 role for glycosylation, *Jt. Bone Spine.* 86 (2019) 562–567.
29 <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2019.01.005>.
- 30 [40] H.U. Scherer, D. van der Woude, A. Ioan-Facsinay, H. el Bannoudi, L.A. Trouw, J. Wang, T.
31 Häupl, G.-R. Burmester, A.M. Deelder, T.W.J. Huizinga, M. Wuhler, R.E.M. Toes, Glycan
32 profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid,
33 *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 1620–1629. <https://doi.org/10.1002/art.27414>.

- 1 [41] C.C. Reparon-Schuijt, W.J.E. van Esch, C. van Kooten, G.A. Schellekens, B.A.W. de Jong,
2 W.J. van Venrooij, F.C. Breedveld, C.L. Verweij, Secretion of anti-citrulline-containing
3 peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 41–47.
4 [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200101\)44:1<41::AID-ANR6>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200101)44:1<41::AID-ANR6>3.0.CO;2-0).
- 5 [42] L. Innala, H. Kokkonen, C. Eriksson, E. Jidell, E. Berglin, S.R. Dahlqvist, Antibodies against
6 mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early
7 rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides., *J. Rheumatol.* 35
8 (2008) 1002–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18398946>.
- 9 [43] Y. Chen, P.T. Dawes, J.C. Packham, D.L. Matthey, Interaction between smoking and functional
10 polymorphism in the TGFB1 gene is associated with ischaemic heart disease and myocardial
11 infarction in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study, *Arthritis Res. Ther.* 14
12 (2012) R81. <https://doi.org/10.1186/ar3804>.
- 13 [44] P.M.J. Welsing, R.B.M. Landewé, P.L.C.M. Van Riel, M. Boers, A.M. Van Gestel, S. Van Der
14 Linden, H.L. Swinkels, D.M.F.M. Van Der Heijde, The relationship between disease activity
15 and radiologic progression in patients with rheumatoid arthritis: A longitudinal analysis,
16 *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 2082–2093. <https://doi.org/10.1002/art.20350>.
- 17 [45] A. Kavanaugh, R.M. Fleischmann, P. Emery, H. Kupper, L. Redden, B. Guerette, S. Santra,
18 J.S. Smolen, Clinical, functional and radiographic consequences of achieving stable low
19 disease activity and remission with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone in
20 early rheumatoid arthritis: 26-week results from the randomised, controlled OPTIMA study,
21 *Ann. Rheum. Dis.* 72 (2013) 64–71. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-201247>.
- 22 [46] J.S. Smolen, D.M.F.M. Van Der Heijde, E.W. St.Clair, P. Emery, J.M. Bathon, E. Keystone,
23 R.N. Maini, J.R. Kalden, M. Schiff, D. Baker, C. Han, J. Han, M. Bala, Predictors of joint
24 damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with high-dose methotrexate with or
25 without concomitant infliximab: Results from the ASPIRE trial, *Arthritis Rheum.* 54 (2006)
26 702–710. <https://doi.org/10.1002/art.21678>.
- 27 [47] J.S. Smolen, R. Landewé, F.C. Breedveld, M. Buch, G. Burmester, M. Dougados, P. Emery, C.
28 Gaujoux-Viala, L. Gossec, J. Nam, S. Ramiro, K. Winthrop, M. de Wit, D. Aletaha, N.
29 Betteridge, J.W.J. Bijlsma, M. Boers, F. Buttgereit, B. Combe, M. Cutolo, N. Damjanov,
30 J.M.W. Hazes, M. Kouloumas, T.K. Kvien, X. Mariette, K. Pavelka, P.L.C.M. van Riel, A.
31 Rubbert-Roth, M. Scholte-Voshaar, D.L. Scott, T. Sokka-Isler, J.B. Wong, D. van der Heijde,
32 EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and
33 biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update, *Ann. Rheum. Dis.* 73 (2014)
34 492–509. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204573>.

- 1 [48] J.S. Smolen, F.C. Breedveld, G.R. Burmester, V. Bykerk, M. Dougados, P. Emery, T.K. Kvien,
2 M.V. Navarro-Compán, S. Oliver, M. Schoels, M. Scholte-Voshaar, T. Stamm, M. Stoffer, T.
3 Takeuchi, D. Aletaha, J.L. Andreu, M. Aringer, M. Bergman, N. Betteridge, H. Bijlsma, H.
4 Burkhardt, M. Cardiel, B. Combe, P. Durez, J.E. Fonseca, A. Gibofsky, J.J. Gomez-Reino, W.
5 Graninger, P. Hannonen, B. Haraoui, M. Kouloumas, R. Landewe, E. Martin-Mola, P. Nash,
6 M. Ostergaard, A. Östör, P. Richards, T. Sokka-Isler, C. Thorne, A.G. Tzioufas, R. van
7 Vollenhoven, M. de Wit, D. van der Heijde, Treating rheumatoid arthritis to target: 2014
8 update of the recommendations of an international task force, *Ann. Rheum. Dis.* 75 (2016) 3–
9 15. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207524>.
- 10 [49] C.F. Terry, V. Loukaci, F.R. Green, Cooperative Influence of Genetic Polymorphisms on
11 Interleukin 6 Transcriptional Regulation, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18138–18144.
12 <https://doi.org/10.1074/jbc.M000379200>.
- 13 [50] G.C. Martelossi Cebinelli, K. Paiva Trugilo, S. Badaró Garcia, K. Brajão de Oliveira, TGF- β 1
14 functional polymorphisms: a review, *Eur. Cytokine Netw.* 27 (2016) 81–89.
15 <https://doi.org/10.1684/ecn.2016.0382>.
- 16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

1

2

3 **Table 1** Socio-demographic, clinical, and laboratory data in rheumatoid arthritis (RA) patients
4 and controls.

	Controls (n=168)	RA (n = 262)	p-value*
Age (year)	39 (31–47)	57 (47–63)	< 0.001
Sex (Female/Male)	136 (81.0) / 32 (19.0)	220 (84.0) / 42 (16.0)	0.419
Ethnicity (Caucasiana/Not-Caucasian)	129 (76.8) / 39 (23.2)	185 (70.6) / 77 (29.6)	0.159
Body mass index (Kg/cm ²)	24.90 (22.08–28.65)	27.43 (23.73–31.57)	< 0.001
Smoking (yes/no)	17/151	41/221	0,101
TGF- β 1 (pg/mL)	693.9 (309.1–1832.5)	530.9 (299.2–867.8)	< 0.001
Disease duration (year)	-	10 (4–19)	
DAS28 \geq 3.2	-	135 (53.1)	
Positive RF	-	133 (51.0)	
Positive Anti-CCP	-	153 (59.5)	
Extra-articular manifestation	-	27 (10.3)	
Prednisone	-	180 (68.7)	
Methotrexate	-	175 (66.8)	
TNF inhibitor	-	65 (24.8)	
Leflunomide	-	108 (41.2)	
Antimalarials	-	99 (37.8)	

5 χ^2 test. Data were expressed by absolute number (%). Mann-Whitney test. Data were expressed as median and
6 percentile (25%–75%). *p-value adjusted by age, sex, ethnicity, body mass index and smoking. RF: rheumatoid
7 factor; DAS: disease activity score; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C reactive protein; Anti-CCP: anti-
8 cyclic citrullinated peptide; TNF: tumoral necrosis factor.

9

Table 2 Distribution of genotypes and allele frequencies of *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T variants between rheumatoid arthritis (RA) patients and controls.

		Controls (n=168)	RA (n=262)	OR (95% CI)	p- value
<i>TGFBI</i> +869 T>C (rs1800470)¹					
Allele model	T	181 (53.9)	293 (56.1)	Reference	-
	C	155 (46.1)	229 (43.9)	0.87 (0.61–1.23)	0.442
Codominant	TT	46 (27.4)	79 (30.3)	Reference	-
	TC	89 (53.0)	135 (51.7)	0.93 (0.52–1.66)	0.816
	CC	33 (19.6)	47 (18.0)	0.75 (0.36–1.56)	0.443
Dominant	TT	46 (27.4)	79 (30.3)	Reference	-
	TC+CC	122 (72.6)	182 (69.7)	0.88 (0.51–1.53)	0.652
Recessive	TT+TC	135 (80.4)	214 (82.0)	Reference	-
	CC	33 (19.6)	47 (18.0)	0.79 (0.42–1.46)	0.449
<i>TGFBI</i> -509 C>T (rs1800469)²					
Allele model	C	210 (62.5)	348 (66.4)	Reference	-
	T	126 (37.5)	176 (33.6)	0.57 (0.52–1.08)	0.132
Codominant	CC	63 (37.5)	114 (43.5)	Reference	-
	CT	84 (50.0)	120 (45.8)	0.759 (0.45–1.29)	0.310
	TT	21 (12.5)	28 (10.7)	0.58 (0.26–1.31)	0.193
Dominant	CC	63 (37.5)	114 (43.5)	Reference	-
	CT+TT	105 (62.5)	148 (56.5)	0.72 (0.43–1.19)	0.205
Recessive	CC+CT	147 (87.5)	234 (89.3)	Reference	-
	TT	21 (12.5)	28 (10.7)	0.68 (0.32–1.44)	0.314

χ^2 : results of analyses of contingency tables. Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%). RA: rheumatoid arthritis; OR: odds ratio; CI: confidence interval. Results of logistic regression analysis adjusted by age, sex, and ethnicity.

¹The genotyping was successful in 261 cases and 168 controls for rs1800470;

²The genotyping was successful in 262 cases and 168 controls for rs1800469.

Table 3 Haplotype frequencies of *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T variants in rheumatoid arthritis patients and controls.

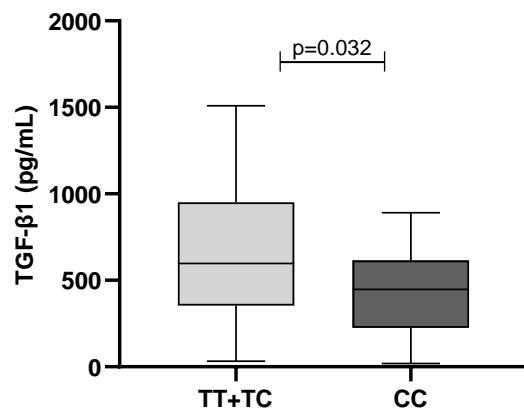
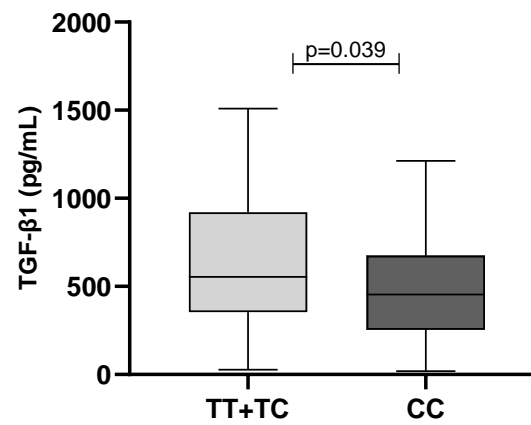
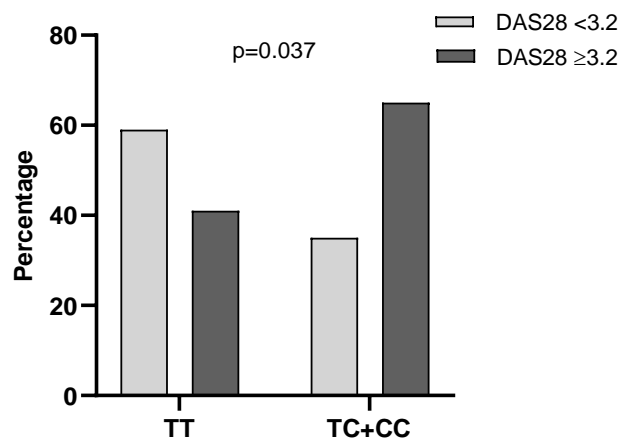
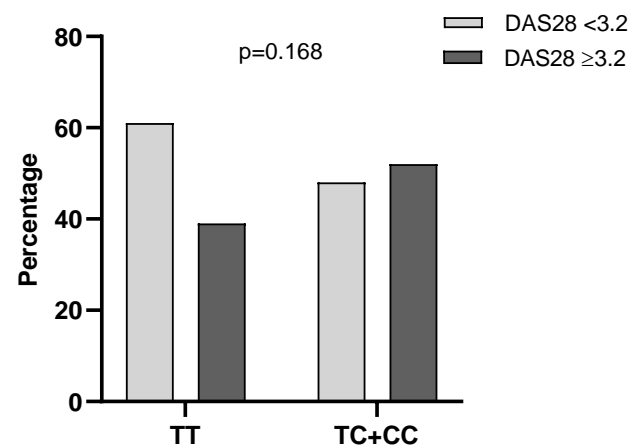
<i>TGFBI</i> +869 (rs1800470)	<i>TGFBI</i> -509 (rs1800469)	Controls frequency	RA frequency	OR (95% CI)	p-value
T	C	0.535	0.560	Reference	-
C	T	0.372	0.334	1.26 (0.86–1.86)	0.24
C	C	0.089	0.104	0.81 (0.44–1.50)	0.51
T	T	0.003	0.002	1.41 (0.03–62.26)	0.86

D' =0.986 and r^2 =0.806. RA: rheumatoid arthritis; OR: odds ratio; CI: confidence interval. Results of logistic regression analysis adjusted by age, sex, and ethnicity.

Table 4 Autoantibodies, disease activity status, and TGF- β 1 plasma levels according to *TGFBI* +869 T>C and *TGFB* -509 C>T variants in rheumatoid arthritis patients.

<i>TGFBI</i> +869 T>C	TT (n=79)	TC (n=135)	CC (n=47)	OR (95% CI) TT vs TC	p	OR (95% CI) TT vs CC	p
RF Positive	40 (50)	67 (50)	25 (53.2)	1.01 (0.58–1.77)	0.967	1.21 (0.58–2.52)	0.608
Anti-CCP Positive	49 (62)	74 (55.6)	29 (63)	1.28 (0.72–2.27)	0.397	1.08 (0.50–2.32)	0.843
DAS28 \geq 3.2	37 (50)	68 (51.5)	30 (63.8)	0.94 (0.53–1.67)	0.834	1.85 (0.86–3.98)	0.112
TGF- β 1 (pg/mL)	556.9 (380.4–942.6)	518.7 (271.3–842.7)	493.9 (308.9–722.2)	1.00 (0.99–1.00)	0.874	1.00 (0.99–1.00)	0.546
CRP (mg/L)	3.80 (1.50–11.40)	4.09 (1.43–10.82)	5.84 (1.76–8.89)	1.01 (0.98–1.04)	0.514	1.01 (0.98–1.04)	0.514
ESR (mm/h)	19 (8–34)	19 (10–33)	18 (9–27)	1.01 (0.99–1.02)	0.421	1.00 (0.98–1.02)	0.703
<i>TGFBI</i> -509 C>T	CC (n=114)	CT (n=120)	TT (n=28)	OR (95% CI) CC vs CT	p	OR (95% CI) CC vs TT	p
RF Positive	59 (51.8)	59 (49.6)	15 (53.6)	1.06 (0.63–1.78)	0.810	0.83 (0.35–1.95)	0.680
Anti-CCP Positive	68 (60.2)	66 (55.9)	19 (67.9)	1.21 (0.71–2.05)	0.476	0.645 (0.25–1.60)	0.347
DAS28 \geq 3.2	52 (47.7)	64 (54.7)	19 (67.9)	0.76 (0.45–1.28)	0.307	2.58 (1.04–6.42)	0.041
TGF- β 1 (pg/mL)	539.5 (354.4–900.7)	508.6 (257.2–867.8)	529.6 (432.5–726.9)	1.00 (0.99–1.00)	0.951	1.00 (0.99–1.00)	0.480
CRP (mg/L)	3.90 (1.43–12.90)	3.76 (1.40–7.35)	7.19 (2.74–10.90)	0.99 (0.98–1.01)	0.702	1.00 (0.97–1.02)	0.838
ESR (mm/h)	20 (8–36)	17 (9–27)	21 (10–37)	0.99 (0.97–1.00)	0.230	1.00 (0.98–1.02)	0.797

Results of logistic regression analysis adjusted by age, sex, ethnicity, and BMI. Disease duration and treatment did not differ between the study groups. Categorical data were expressed as absolute number (*n*) and percentage (%) or mean and percentile (25%–75%). OR: odds ratio; CI: confidence interval; RF: rheumatoid factor; Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; DAS: disease activity score; TGF- β 1: transforming growth factor beta 1; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C reactive protein.

A) RF positive and *TGFB1* +869 T>CB) Anti-CCP positive and *TGFB1* +869 T>CC) RF high and *TGFB1* +869 T>CD) Anti-CCP high and *TGFB1* +869 C>T

1 **Figure 1.** A) Transforming growth factor (TGF)- β 1 plasma levels in patients with rheumatoid factor
2 (RF) positive according to *TGFBI* +869 T>C variants (recessive model); B) TGF- β 1 plasma levels
3 plasma levels in patients with anti-CCP positive according to *TGFBI* +869 T>C variants (recessive
4 model); C) DAS28 status in patients with high RF (>90 U/mL) according to *TGFBI* +869 T>C variants
5 (dominant model); D) DAS28 status in patients with high anti-CCP (>15 U/mL) according to *TGFBI*
6 +869 T>C variants (dominant model). Results expressed as median and percentile (25–75). P-value
7 adjusted by age, sex, ethnicity, BMI, and treatment.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 5.2 ARTIGO 2

2 **Involvement of *IL10* (rs1800782) variant with autoantibody in rheumatoid arthritis**
3 **patients**

4

5 Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda^{1,2}, Tamires Flauzino², Neide Tomimura Costa³, Marcell
6 Alysson Batisti Lozovoy^{2,4}, Edna Maria Vissoci Reiche^{2,4}, Andréa Name Colado Simão^{2,4}.

7

8 1 Department of Rheumatology, Pontifical Catholic University of Paraná, Londrina, PR,
9 Brazil10 2 Laboratory of Research in Applied Immunology, Health Sciences Center, State
11 University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

12 3 Department of Rheumatology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

13 4 Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center,
14 State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

15

16

17 * Corresponding author: Andréa Name Colado Simão. Postal address:
18 Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center,
19 University Hospital, State University of Londrina, Av. Robert Koch 60, Londrina, Paraná,
20 Brazil. CEP: 86038-440. Tel/Fax: +55-43-3371-2619.

21

22

23

24

1

2 **Abstract**

3 **Objective:** To evaluate the association between the *IL10* -592 C>A (rs1800782) variant with
4 susceptibility for rheumatoid arthritis (RA), disease activity, presence of rheumatoid factor
5 (RF), anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP), and IL-10 plasma levels. **Methods:** A total
6 of 262 patients with RA and 168 control group were tested for the *IL10* -592 C>A variant using
7 a polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism
8 (RFLP). IL-10 serum levels were measured using an ELISA kit. RF were determined by
9 turbidimetric assay and anti-CCP by chemiluminescence microparticle immunoassay. Disease
10 activity status was determined using the Disease Activity Score in 28 joints (DAS28). **Results:**
11 The variant *IL10* -592 C>A was not associated with RA susceptibility, disease activity, nor IL-
12 10 plasma levels. However, patients with the *IL10* -592 AA genotype had a highest chance of
13 positive RF (OR 2.78, 95% CI 1.15–6.67, p=0.022), p=0.041) than patients with CC genotype.
14 **Conclusion:** The *IL10* -592 C>A variant was associated with the presence of RF, independently
15 of disease activity and other confounding factors. Our findings suggest that the *IL10* -592 C>A
16 variant may help to identify earlier those patients with a more severe disease course that will
17 benefit with a more intensive therapeutic approach.

18 **Keywords:** Rheumatoid arthritis; Genetic variants; Interleukin-10; rs1800782.

19

20 **Key points:**

21 The *IL10* -592 C>A variant was not associated with susceptibility, disease activity and IL-10
22 plasma levels in RA patients from the Southern Brazilian population.

1 The *IL10* -592 C>A variant was associated with the presence of RF, independently of other
2 confounding factors.

3 **Introduction**

4 Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized
5 by progressive joint destruction in which both genetic and environmental factors contribute to
6 susceptibility and severity [1]. Chronic inflammation in RA is supported by the predominance
7 of pro-inflammatory over anti-inflammatory cytokines [1]. IL-10 is known by its anti-
8 inflammatory properties [1,2]. In RA, the pro-inflammatory milieu themselves appear to trigger
9 the synthesis of IL-10 [3] as a compensatory phenomenon [4]. On the other hand, IL-10 can
10 stimulate B cell proliferation, differentiation, and survival [5–7], favoring autoantibodies
11 production and isotype switching [8,9]. More severe radiographic damage correlates with the
12 presence of the autoantibodies rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptide
13 (anti- CCP) [10].

14 Single nucleotide variants (SNV) may result in different cytokine production and
15 influence disease susceptibility, severity, and outcome [11]. The *IL10* gene is located on
16 chromosome 1q31-32 region. The *IL10* -592 C>A variant is associated with a risk of developing
17 several autoimmune diseases, including RA [12–14]. Previous studies demonstrated that the
18 CC genotype was associated with elevated IL-10 levels [15] and the A allele with decreased
19 IL-10 plasma levels in RA patients [16].

20 The association of RA with the *IL10* -592 C>A variant has been studied in different
21 ethnic populations with inconsistent results, and the relationship with altered IL-10 plasma
22 levels, clinical e laboratory parameters in RA patients are scarce and contradictory [15–19].
23 Therefore, the present study aimed to evaluate the association between the *IL10* -592 C>A

1 variant with susceptibility and disease activity, autoantibodies, and cytokine plasma levels in
2 RA patients from the Southern Brazilian population.

3 **Methods**

4 *Subjects*

5 The study included 430 subjects: 168 healthy individuals (control group) selected
6 among blood donors of the University Hospital and 262 patients with RA selected from the
7 Rheumatology Outpatient of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. RA patients
8 were diagnosed according to the 2010 RA classification criteria [20]. Information about
9 lifestyle and medical history was obtained at clinical evaluation. The ethnicity was self-reported
10 as Caucasian and non-Caucasian (Asian, Black, and Afro-Brazilian). All procedures performed
11 in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the
12 institutional and/or national research committee.

13 *Clinical and Laboratory Assessments*

14 Disease activity status was determined using the Disease Activity Score (DAS) in 28
15 joints based on C-reactive protein (CRP). According to DAS28 values, patients can be classified
16 into two groups of disease activity: remission/mild (DAS28 <3.2) and moderate/severe (DAS28
17 ≥ 3.2) [21,22]. BMI calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Anti-CCP antibody
18 levels were determined by chemiluminescence microparticle immunoassay (Architect, Abbott
19 Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Serum high sensitivity CRP and RF were measured using
20 a turbidimetric assay (C8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). According to the
21 manufacturer's instructions, RF and anti-CCP were positive when the values were ≥ 30 U/mL
22 and ≥ 5 U/mL, respectively. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was obtained by an
23 automated kinetic-photometric method (Ves-Matic CUBE 30, DIESSE, Siena, Italy). IL-10

1 plasma levels were determined using microspheres immunofluorometric assay (ProcartaPlex
2 by Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria) for the Luminex platform (MAGPIX™, Luminex
3 Corp., Austin, TX, USA).

4 *IL10 genetic variant genotyping*

5 One SNV in the promoter region of the *IL10* gene located on chromosome 1 were
6 genotyped: -592 A>C (rs1800872) at position 206773062, according to listed in the
7 international database. To genotype the *IL10* -592 A>C variant, approximately 100 ng of DNA
8 was used in the polymerase chain reaction (PCR), using primers synthesized according to the
9 sequence deposited in the GenBank under the accession number NG_012088.1. The forward
10 primer formed by the sequence 5'GTG GAA ACA TGT GCC TGA GA 3' and the reverse
11 primer formed by the sequence 5'ATG AGG GGG TGG GCT AAA TA 3'. The PCR was
12 performed in a thermal cycler (Applied Biosystems Veriti™ 96-well Thermal Cycler, Life
13 Technologies, Foster City, CA, USA) with negative control (without a DNA sample). After
14 amplifying a 154 bp sequence of the *IL10* gene, it was submitted to digestion with the restriction
15 enzyme *RsaI* (Anza™, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The digestion
16 products were analyzed according to restriction fragment length polymorphism (RFLP) by
17 electrophoreses in 10% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Allele A will be
18 defined with fragments of 79 and 75 bp, while allele C does not undergo cleavage remaining at
19 154 bp [23].

20 *Statistical analysis*

21 Categorical data were evaluated by the chi-square (χ^2) test and expressed as absolute
22 number (n) and percentage (%). Continuous data assessed by the Mann-Whitney test and
23 described as median and percentile range (25%–75%). The p-value was adjusted for extraneous
24 variables by binary logistic regression analysis. The odds ratio (OR) and 95% confidence

1 interval (95% CI) were calculated. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was performed in the
2 SNPStats program [24]. LD between the specified SNVs was provided by describing D' and r^2
3 value. All statistical analyzes had performed with SPSS for Windows, version 24.0 (SPSS 31
4 Inc., CHICAGO, IL, USA) and the SNPStats program. Statistical significance was set at
5 $p < 0.05$.

6 **Results**

7 Table 1 shows socio-demographic, clinical, and laboratory data in RA patients and
8 controls. Patients and controls did not differ in sex ($p = 0.419$) and ethnicity ($p = 0.159$). We found
9 that patients with RA were older ($p < 0.001$) and had a higher BMI ($p < 0.001$) than controls. The
10 groups did not differ regarding smoking ($p = 0.101$). Thus, we have adjusted the results for
11 possible effects of age, sex, ethnicity, and BMI in multivariate analyses. The median disease
12 duration was ten years (4–19) and 135 (53.1%) patients were in moderate/severe disease activity
13 evaluated by $DAS28 \geq 3.2$. The IL-10 levels differed significantly between groups, with
14 increased IL-10 plasma levels in the RA group.

15 Table 2 shows the distribution of genotypes and allele frequencies of *IL10* -592 C>A
16 variant between patients with RA and controls. The genotypes' frequency in codominant,
17 dominant, and recessive genetic models did not differ between patients with RA and controls
18 ($p > 0.05$). No significant associations were found in the allele frequencies as well. All the
19 analyses in table 2 were adjusted by age, sex and ethnicity. The genotype distribution of *IL10* -
20 592 C>A was consistent with those expected from the HWE ($p > 0.05$) in both groups (patients
21 and controls).

22 In the present study, we evaluated whether the *IL10* -592 C>A variant could interfere in
23 disease activity, laboratory biomarkers, and IL-10 plasma levels in RA patients (Table 3).

1 Patients with the AA genotype had a higher frequency of RF positive than those with the CC
2 genotype [OR 2.78 (1.15–6.67), $p=0.022$], even after adjusted by age, sex, ethnicity, BMI, and
3 treatment. However, anti-CCP status, disease activity, ESR, and CRP and IL-10 levels were not
4 associated with the *IL10* -592 C>A variant. Disease duration and treatment also did not differ
5 between the study groups. We also observed that this variant did not interfere in ESR, CRP,
6 and IL-10 plasma levels in health control (data not shown). Further, we evaluated whether the
7 *IL10* -592 C>A variant could have a differential effect in patients with positive RF or anti-CCP.
8 No differences were observed between IL-10 levels or disease activity with *IL10* -592 C>A
9 genotypes in RA patients, independently of seropositivity for RF or anti-CCP and other
10 confounding factors (data not shown).

11 **Discussion**

12

13 The main findings of the present study are that the *IL10* -592 C>A variant was not
14 associated with RA susceptibility, disease activity, and IL-10 plasma levels. However, patients
15 with the *IL10* -592 AA genotype had a highest chance of positive RF than those with CC
16 genotype.

17 We demonstrated that RA patients had higher IL-10 levels than controls, in agreement
18 with previous studies that also demonstrated elevated IL-10 in the serum and synovial fluid of
19 RA patients [4,15,25,26]. Otherwise, Qu et al. [27] reported reduced IL-10 levels in RA
20 patients. IL-10 is a potent inhibitor of the production of proinflammatory mediators by
21 macrophages, and could be found in higher levels in RA patients in an attempt of mitigating
22 immune response, but frequently these levels are insufficient to do it [28,29].

23 We did not find an association between the *IL10* -592 C>A variant with RA
24 susceptibility, in agreement with previous studies [17,18,30–33]. Otherwise, some studies have
25 shown an association between the A allele and RA susceptibility [11,16,19,25]. A recent meta-

1 analysis by Liu et al. [12] observed a significant association between RA and two *IL10* -592
2 C>A genetic models (codominant model AC vs. AA and dominant model AC + CC vs. AA)
3 for Caucasians. In addition, we also failed to find any association between *IL10* -592 C>A
4 genotypes and IL-10 plasma levels. Different from our findings, Hee et al. [16] found
5 significantly lower levels in patients with CA and AA genotype than in controls, corroborated
6 to other studies that found significantly higher levels of IL-10 in patients with CC genotype
7 compared to AC genotype [15,25]. Regarding to disease activity, data are contradictory. Our
8 data demonstrated that the *IL10* -592 C>A variant was not associated with disease activity, in
9 agreement with other studies [11,18]. However, Ge et al [15] found a higher frequency of the
10 CC genotype in patients with DAS28 \geq 3.2. These discrepancies may be due to genotyping
11 methods, source of controls, and ethnic differences, since all the studies so far that had evaluated
12 IL-10 levels carried out in Asian populations. Furthermore, there is a need to control for
13 possible confounding variables such as BMI, since obesity is associated with increased serum
14 IL-10 levels [34].

15 In the present study, we demonstrated that the *IL10* -592 AA genotype was associated
16 with the presence of RF. Some studies have evaluated the association of the *IL10* -592 C>A
17 variant with RF but with controversial findings. While Ciccacci et al. [19] also find the same
18 association, Ge et al. [15] demonstrated that the CC genotype was associated with RF, and other
19 authors were found no association [16–18,31,33]. These inconsistent results may be explained
20 by sample size, ethnicity, age, and treatment. RF has increased frequency in older people [35],
21 so we have adjusted the results for possible age effects since our RA patients group was older
22 than the control group and with other studies [17,18,31,33]. Furthermore, immunosuppressive
23 treatment can decrease RF serum levels [13,36]. The methotrexate use was similar or higher
24 than our study [19,33], but some studies did not refer to the adjustment for possible confounding
25 effects of treatment in the association of the variants with RF [15–18,31]. We hypothesises that

1 the *IL10* -592 C>A variant could increase the IL-10 expression and, consequently, IL-10 plasma
2 levels, which induce naive and activated B cells to promote the production of serum RF and
3 anti-CCP antibodies [8,37,38]. Considering that high titers of RF are associated with a more
4 aggressive articular disease, increased disease activity, reduced remission rates, and extra-
5 articular involvement [10,39], we assume that the *IL10* -592 AA genotype could be associated
6 with a worse prognosis.

7 Some limitations of this study should be considered. First, this is a case-control design,
8 which does not allow inferences on a causal relationship. Second, the study design was based
9 on a single basal cytokine's measurement and specific SNV determination, which precludes the
10 assessment of how other genetic factors may impact on the complex relationship between
11 genotype, cytokine levels, and disease activity. However, this study has some strengths that
12 include controlling for many possible confounding variables like age, ethnicity, BMI, and
13 treatment. Besides, to our knowledge, this is the first study to investigate the relationship
14 between these variants in RA patients from the Brazilian population, considered a very
15 miscegenated population.

16 In conclusion, although the *IL10* -592 C>A variant was not associated with RA
17 susceptibility, the *IL10* -592 AA genotype was associated with the presence of RF,
18 independently of other confounding factors. Our findings suggested that the *IL10* -592 C>A
19 variant could be used to predict a more severe disease course in RA patients and, thus, allow
20 the most appropriate therapeutic approach.

21

22

23

1 **Acknowledgements:** The study was supported by grants from Coordination for the
2 Improvement of Higher Level of Education Personnel (CAPES) and Institutional Program for
3 Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and
4 Technological Development (CNPq).

5 **Author's contribution:** Conception and research design: ANCS, TF; Manuscript writing and
6 discussion of results: ANCS, EMVR, TMVI, TF; Data collection: TF, TMVI, NTC; Laboratory
7 analysis: TF, MABL; Statistical analysis: ANCS, TF. All authors have read and approved the
8 final manuscript.

9 **Compliance with ethical standards**

10 **Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

11 **Ethical approval:** This study was conducted after approval by the Institutional Research Ethics
12 Committees of University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 06405812.1.0000.5231). All
13 procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the
14 ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964
15 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards

16 **Informed consent:** All the participants included in this study provided written informed
17 consent.

18

19 **References**

- 20 [1] S. Mateen, A. Zafar, S. Moin, A.Q. Khan, S. Zubair, Understanding the role of cytokines in the
21 pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Clin. Chim. Acta.* 455 (2016) 161–171.
22 <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.02.010>.
- 23 [2] W.P. Arend, Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of

- 1 interleukin-1 receptor antagonist, *Semin. Arthritis Rheum.* 30 (2001) 1–6.
2 <https://doi.org/10.1053/sarh.2001.23693>.
- 3 [3] E.W. St Clair, Interleukin 10 treatment for rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 58 (1999)
4 i99–i102. <https://doi.org/10.1136/ard.58.2008.i99>.
- 5 [4] A.K. Shrivastava, H.V. Singh, A. Raizada, S.K. Singh, A. Pandey, N. Singh, D.S. Yadav, H.
6 Sharma, Inflammatory markers in patients with rheumatoid arthritis, *Allergol. Immunopathol.*
7 (Madr). 43 (2015) 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2013.11.003>.
- 8 [5] Y. Levy, J.C. Brouet, Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by
9 induction of the bcl-2 protein., *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 424–8.
10 <https://doi.org/10.1172/JCI116977>.
- 11 [6] F. Rousset, S. Peyrol, E. Garcia, N. Vezzio, M. Andujar, J.A. Grimaud, J. Banchereau, Long-
12 term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-
13 10 but not IL-4., *Int. Immunol.* 7 (1995) 1243–53. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.8.1243>.
- 14 [7] N. Burdin, F. Rousset, J. Banchereau, B-cell-derived IL-10: production and function., *Methods.*
15 11 (1997) 98–111. <https://doi.org/10.1006/meth.1996.0393>.
- 16 [8] T. Defrance, B. Vanbervliet, F. Brière, I. Durand, F. Rousset, J. Banchereau, Interleukin 10 and
17 transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells
18 to secrete immunoglobulin A., *J. Exp. Med.* 175 (1992) 671–82.
19 <https://doi.org/10.1084/jem.175.3.671>.
- 20 [9] P. Jeannin, S. Lecoanet, Y. Delneste, J.F. Gauchat, J.Y. Bonnefoy, IgE versus IgG4 production
21 can be differentially regulated by IL-10., *J. Immunol.* 160 (1998) 3555–61.
22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531318>.
- 23 [10] S. Bugatti, A. Manzo, C. Montecucco, R. Caporali, The Clinical Value of Autoantibodies in
24 Rheumatoid Arthritis, *Front. Med.* 5 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00339>.
- 25 [11] A. Paradowska-Gorycka, J. Trefler, J. Maciejewska-Stelmach, J.K. Łacki, Interleukin-10 gene
26 promoter polymorphism in Polish rheumatoid arthritis patients, *Int. J. Immunogenet.* 37 (2010)
27 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00913.x>.
- 28 [12] Q. Liu, J. Yang, H. He, Y. Yu, J. Lyu, Associations between interleukin-10 polymorphisms and
29 susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis and meta-regression., *Clin. Rheumatol.*
30 37 (2018) 3229–3237. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4329-2>.
- 31 [13] G.G. Song, S.J. Choi, J.D. Ji, Y.H. Lee, Associations between interleukin-10 polymorphisms
32 and susceptibility to systemic lupus erythematosus: A meta-analysis, *Hum. Immunol.* 74

- 1 (2013) 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.11.020>.
- 2 [14] P.H. Salim, M. Jobim, M. Bredemeier, J.A.B. Chies, J.C.T. Brenol, L.F. Jobim, R.M. Xavier,
3 Interleukin-10 gene promoter and NFKB1 promoter insertion/deletion polymorphisms in
4 systemic sclerosis., *Scand. J. Immunol.* 77 (2013) 162–8. <https://doi.org/10.1111/sji.12020>.
- 5 [15] L. Ge, Y. Huang, H. Zhang, R. Liu, N. Xu, Association between polymorphisms of interleukin
6 10 with inflammatory biomarkers in East Chinese Han patients with rheumatoid arthritis, *Jt.*
7 *Bone Spine.* 82 (2015) 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2014.11.007>.
- 8 [16] C.S. Hee, S.C. Gun, R. Naidu, E. Gupta, S.D. Somnath, A.K. Radhakrishnan, Comparison of
9 single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-10 gene promoter between
10 rheumatoid arthritis patients and normal subjects in Malaysia, *Mod. Rheumatol.* 17 (2007)
11 429–435. <https://doi.org/10.1007/s10165-007-0612-9>.
- 12 [17] O. Ates, G. Hatemi, V. Hamuryudan, A. Topal-Sarikaya, Tumor necrosis factor-alpha and
13 Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients, *Clin.*
14 *Rheumatol.* 27 (2008) 1243–1248. <https://doi.org/10.1007/s10067-008-0893-1>.
- 15 [18] D. Gambhir, A. Lawrence, A. Aggarwal, R. Misra, S.K. Mandal, S. Naik, Association of tumor
16 necrosis factor alpha and IL-10 promoter polymorphisms with rheumatoid arthritis in North
17 Indian population, *Rheumatol. Int.* 30 (2010) 1211–1217. <https://doi.org/10.1007/s00296-009-1131-0>.
- 18
- 19 [19] C. Ciccacci, P. Conigliaro, C. Perricone, S. Rufini, P. Triggianese, C. Politi, G. Novelli, R.
20 Perricone, P. Borgiani, Polymorphisms in STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 and MIR146A
21 genes are associated differently with prognostic factors in Italian patients affected by
22 rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Immunol.* 186 (2016) 157–163.
23 <https://doi.org/10.1111/cei.12831>.
- 24 [20] D. Aletaha, T. Neogi, A.J. Silman, J. Funovits, D.T. Felson, C.O. Bingham, N.S. Birnbaum,
25 G.R. Burmester, V.P. Bykerk, M.D. Cohen, B. Combe, K.H. Costenbader, M. Dougados, P.
26 Emery, G. Ferraccioli, J.M.W. Hazes, K. Hobbs, T.W.J. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T.K.
27 Kvien, T. Laing, P. Mease, H.A. Ménard, L.W. Moreland, R.L. Naden, T. Pincus, J.S. Smolen,
28 E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P.P. Tak, K.S. Upchurch, J. Vencovský, F. Wolfe, G.
29 Hawker, 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of
30 Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative, *Arthritis*
31 *Rheum.* 62 (2010) 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>.
- 32 [21] J. Anderson, L. Caplan, J. Yazdany, M.L. Robbins, T. Neogi, K. Michaud, K.G. Saag, J.R.
33 O’Dell, S. Kazi, Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of

- 1 Rheumatology recommendations for use in clinical practice., *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 64
2 (2012) 640–7. <https://doi.org/10.1002/acr.21649>.
- 3 [22] G. Wells, J.-C. Becker, J. Teng, M. Dougados, M. Schiff, J. Smolen, D. Aletaha, P.L.C.M. van
4 Riel, Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against
5 Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in
6 patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythr, *Ann.*
7 *Rheum. Dis.* 68 (2009) 954–60. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.084459>.
- 8 [23] M. Capasso, R.A. Avvisati, C. Piscopo, N. Laforgia, F. Raimondi, F. de Angelis, A. Iolascon,
9 Cytokine Gene Polymorphisms in Italian Preterm Infants: Association Between Interleukin-10
10 –1082 G/A Polymorphism and Respiratory Distress Syndrome, *Pediatr. Res.* 61 (2007) 313–
11 317. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e318030d108>.
- 12 [24] X. Sole, E. Guino, J. Valls, R. Iniesta, V. Moreno, SNPStats: a web tool for the analysis of
13 association studies, *Bioinformatics*. 22 (2006) 1928–1929.
14 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>.
- 15 [25] B. Ying, Y. Shi, X. Pan, X. Song, Z. Huang, Q. Niu, B. Cai, L. Wang, Association of
16 polymorphisms in the human IL-10 and IL-18 genes with rheumatoid arthritis, *Mol. Biol. Rep.*
17 38 (2011) 379–385. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0119-x>.
- 18 [26] E.M.A. Rahman, H. Ezzat, M.M.A. Mohsen, K. Yosef, Interleukin-10, Interleukin- 16 and
19 Interferon- γ in serum of patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity,
20 *Egypt. J. Hosp. Med.* 20 (2005) 46–57.
- 21 [27] C.-H. Qu, Y. Hou, Y.-F. Bi, Q.-R. Han, C.-H. Jiao, Q.-F. Zou, Diagnostic values of serum IL-
22 10 and IL-17 in rheumatoid arthritis and their correlation with serum 14-3-3 η protein., *Eur.*
23 *Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23 (2019) 1899–1906.
24 https://doi.org/10.26355/eurrev_201903_17227.
- 25 [28] B. de PAZ, M. ALPERI-LÓPEZ, F.J. BALLINA-GARCÍA, C. PRADO, C. GUTIÉRREZ, A.
26 SUÁREZ, Cytokines and Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Their Relationship
27 with Response to Corticosteroids, *J. Rheumatol.* 37 (2010) 2502–2510.
28 <https://doi.org/10.3899/jrheum.100324>.
- 29 [29] J.S. Smolen, D. Aletaha, A. Barton, G.R. Burmester, P. Emery, G.S. Firestein, A. Kavanaugh,
30 I.B. McInnes, D.H. Solomon, V. Strand, K. Yamamoto, Rheumatoid arthritis, *Nat. Rev. Dis.*
31 *Prim.* 4 (2018) 18001. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>.
- 32 [30] A. Pawlik, M. Kurzawski, B.G. Szklarz, M. Herczynska, M. Drozdziak, Interleukin-10 promoter
33 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis, *Clin. Rheumatol.* 24 (2005) 480–484.

- 1 <https://doi.org/10.1007/s10067-004-1066-5>.
- 2 [31] O.M. Moreno, C.I. González, D.L. Saaibi, W. Otero, R. Badillo, J. Martín, G. Ramírez,
3 Polimorfismos de la región promotora del gen de la IL-10 y artritis reumatoide en una
4 población colombiana, *Biomédica*. 27 (2007) 56. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.233>.
- 5 [32] D. Trajkov, S. Mishevska-Perchinkova, A. Karadzova-Stojanoska, A. Petlichkovski, A.
6 Strezova, M. Spiroski, Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid
7 arthritis in population of ethnic Macedonians, *Clin. Rheumatol*. 28 (2009) 1291–1300.
8 <https://doi.org/10.1007/s10067-009-1238-4>.
- 9 [33] J. Hernández-Bello, E. Oregón-Romero, M. Vázquez-Villamar, S. García-Arellano, Y. Valle,
10 J.R. Padilla-Gutiérrez, I.V. Román-Fernández, C.A. Palafox-Sánchez, G.E. Martínez-Bonilla,
11 J.F. Muñoz-Valle, Aberrant expression of interleukin-10 in rheumatoid arthritis: Relationship
12 with IL10 haplotypes and autoantibodies, *Cytokine*. 95 (2017) 88–96.
13 <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.02.022>.
- 14 [34] F.M. Schmidt, J. Weschenfelder, C. Sander, J. Minkwitz, J. Thormann, T. Chittka, R. Mergl,
15 K.C. Kirkby, M. Faßhauer, M. Stumvoll, L.M. Holdt, D. Teupser, U. Hegerl, H. Himmerich,
16 Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical
17 Activity, *PLoS One*. 10 (2015) e0121971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121971>.
- 18 [35] J. Ursum, W.H. Bos, R.J. van de Stadt, B.A. Dijkmans, D. van Schaardenburg, Different
19 properties of ACPA and IgM-RF derived from a large dataset: further evidence of two distinct
20 autoantibody systems, *Arthritis Res. Ther*. 11 (2009) R75. <https://doi.org/10.1186/ar2704>.
- 21 [36] J. Sokolove, D.S. Johnson, L.J. Lahey, C.A. Wagner, D. Cheng, G.M. Thiele, K. Michaud, H.
22 Sayles, A.M. Reimold, L. Caplan, G.W. Cannon, G. Kerr, T.R. Mikuls, W.H. Robinson,
23 Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation
24 in rheumatoid arthritis., *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*. 66 (2014) 813–21.
25 <https://doi.org/10.1002/art.38307>.
- 26 [37] L. Perez, J. Orte, J. A. Brieva, Terminal differentiation of spontaneous rheumatoid factor–
27 secreting B cells from rheumatoid arthritis patients depends on endogenous interleukin-10,
28 *Arthritis Rheum*. 38 (1995) 1771–1776. <https://doi.org/10.1002/art.1780381210>.
- 29 [38] C.C. Reparón-Schuijt, W.J.E. van Esch, C. van Kooten, G.A. Schellekens, B.A.W. de Jong,
30 W.J. van Venrooij, F.C. Breedveld, C.L. Verweij, Secretion of anti-citrulline-containing
31 peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*. 44 (2001) 41–47.
32 [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200101\)44:1<41::AID-ANR6>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200101)44:1<41::AID-ANR6>3.0.CO;2-0).
- 33 [39] R.A. Moura, L. Graca, J.E. Fonseca, To B or not to B the conductor of rheumatoid arthritis

1 orchestra., Clin. Rev. Allergy Immunol. 43 (2012) 281–91. [https://doi.org/10.1007/s12016-](https://doi.org/10.1007/s12016-012-8318-y)
2 012-8318-y.

3
4
5
6
7 **Table 1** Socio-demographic, clinical, and laboratory data in patients with rheumatoid arthritis
8 and controls

	Controls (n=168)	RA (n = 262)	p-value*
Age (year)	39 (31–47)	57 (47–63)	< 0.001
Sex (Female/Male)	136 (81.0)/ 32 (19.0)	220 (84.0)/ 42 (16.0)	0.419
Ethnicity (Caucasiana/Not-Caucasian)	129 (76.8) / 39 (23.2)	185 (70.6) / 77 (29.6)	0.159
Body mass index (Kg/cm ²)	24.90 (22.08–28.65)	27.43 (23.73–31.57)	< 0.001
Smoking (yes/no)	17/151	41/221	0,101
IL-10 (pg/mL)	0.10 (0.10–9.57)	1.50 (0.780–2.95)	< 0.001
Disease duration (year)	-	10 (4 – 19)	
DAS28 \geq 3.2	-	135 (53.1)	
Positive RF	-	133 (51.0)	
Positive Anti-CCP	-	153 (59.5)	
Extra-articular manifestation	-	27 (10.3)	
Prednisone	-	180 (68.7)	
Methotrexate	-	175 (66.8)	
TNF inhibitor	-	65 (24.8)	
Leflunomide	-	108 (41.2)	
Antimalarials	-	99 (37.8)	

9 χ^2 test. Data were expressed by absolute number (%). Mann-Whitney test. Data were expressed as median and
10 percentile (25%–75%). *p-value adjusted by age, sex, ethnicity, body mass index and smoking. RA: rheumatoid
11 arthritis; IL: interleukin; RF: rheumatoid factor; DAS: disease activity score; Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated
12 peptide.

13
14
15
16

1

2

Table 2 Distribution of genotypes and allele frequencies of the *IL10* -592 C>A variant between rheumatoid arthritis (RA) patients and controls.

		Controls (n=168)	RA (n=262)	OR (95% CI)	P- value
<i>IL10</i> -592 C>A (rs1800872)¹					
Allele model	C	221 (65.8)	324 (62.1)	Reference	-
	A	115 (34.2)	198 (37.9)	1.11 (0.77–1.61)	0.567
Codominant	CC	74 (44.0)	95 (36.4)	Reference	-
	CA	73 (43.5)	134 (51.3)	1.11 (0.65–1.90)	0.694
	AA	21 (12.5)	32 (12.3)	1.21 (0.55–2.68)	0.629
Dominant	CC	74 (44.0)	95 (36.4)	Reference	-
	CA+AA	94 (56.0)	166 (63.6)	1.13 (0.68–1.89)	0.625
Recessive	CC+CA	147 (87.5)	229 (87.7)	Reference	-
	AA	21 (12.5)	32 (12.3)	1.15 (0.54–2.39)	0.716

χ^2 : results of analyses of contingency tables. Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%).

OR: odds ratio; CI: confidence interval. Results of logistic regression analysis adjusted by age, sex, and ethnicity.

¹The genotyping was successful in 261 cases and 168 controls.

Table 3 Autoantibodies, disease activity status, and IL-10 plasma levels according to the *IL10* -592 C>A variant in rheumatoid arthritis patients.

<i>IL10</i> -592 C>A	CC (n=95)	CA (n=134)	AA (n=32)	OR (95% CI) CC vs CA	p	OR (95% CI) CC vs AA	p
RF Positive	45 (47.4)	65 (48.9)	23 (71.9)	0.95 (0.56–1.62)	0.871	2.78 (1.15–6.67)	0.022
Anti-CCP Positive	53 (56.4)	78 (59.1)	21 (65.5)	0.93 (0.54–1.60)	0.801	1.54 (0.66–3.60)	0.314
DAS28 \geq 3.2	51 (54.3)	71 (55)	13 (43.3)	0.97 (0.57–1.67)	0.929	0.65 (0.28–1.55)	0.323
IL-10 (pg/mL)	1.50 (0.78–3.20)	1.50 (0.76–2.95)	1.53 (0.78–2.65)	1.03 (0.90–1.17)	0.703	1.06 (0.90–1.25)	0.492
CRP (mg/L)	4.60 (1.35–8.60)	4.60 (1.85–10.97)	3.22 (1.28–7.77)	1.01 (0.99–1.04)	0.081	1.01 (0.98–1.04)	0.411
ESR (mm/h)	20 (11–30)	18 (7–31)	14 (8–45)	0.99 (0.98–1.01)	0.566	1.01 (0.98–1.026)	0.467

Results of logistic regression analysis adjusted by age, sex, ethnicity, and BMI. Disease duration and treatment did not differ between the study groups. Data were expressed as absolute number (*n*) and percentage (%) or mean and percentile (25%–75%). OR: odds ratio; CI: confidence interval; RF: rheumatoid factor; Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; DAS: disease activity score; IL: interleukin; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C reactive protein.

1 6 CONCLUSÃO

- 2 • Em relação às variantes -509 C>T e +869 T>C do gene *TGFB1*:
- 3 ○ Não foram associadas com suscetibilidade à AR, individualmente ou em
4 haplótipos.
- 5 ○ O genótipo CC da variante +869 T>C do *TGFB1* foi associado a menores
6 níveis plasmáticos de TGF-β1 apenas em pacientes soropositivos para FR
7 ou anti-CCP.
- 8 ○ Pacientes com elevados títulos de FR e presença do alelo C da variante
9 +869 T>C do *TGFB1* apresentaram maior frequência de atividade
10 moderada/grave da AR.
- 11 ○ A variante -509 C>T do *TGFB1* não foi associada aos níveis plasmáticos de
12 TGF-β1 e à presença de autoanticorpos em pacientes com AR.
- 13 ○ O genótipo TT da variante -509 C>T do *TGFB1* foi independentemente
14 associado a maior chance de doença em atividade moderada/grave pelo
15 DAS28 (OR 2,58, 95% IC 1,04-6,42, p=0,041).
- 16
- 17 • Em relação à variante -592 C>A do gene *IL10*:
- 18 ○ Não foi associada com suscetibilidade à AR.
- 19 ○ Não foi associada aos níveis plasmáticos de IL-10 e à atividade da doença
20 em pacientes com AR.
- 21 ○ O genótipo AA foi associado à maior chance FR positivo (OR 2,78, 95% IC
22 1,15-6,67, p=0,022) em relação ao genótipo CC, independentemente da
23 idade, sexo, etnia, IMC, duração da doença e tratamento.

1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 Algumas limitações deste estudo devem ser consideradas. O desenho
3 do estudo foi baseado em uma única mensuração de citocina basal e determinação
4 de SNVs específicos, o que impede a avaliação de como outros fatores genéticos
5 podem impactar a relação complexa entre genótipo, níveis de citocina e atividade da
6 doença. No entanto, o presente estudo apresenta alguns pontos fortes. Este estudo
7 combina uma abordagem estatística multivariada, permitindo controlar possíveis
8 variáveis confundidoras, além da inclusão de um número maior de participantes e
9 controles, que foram recrutados na mesma área de captação. Além disso, até onde
10 sabemos, este é o primeiro estudo a investigar a relação entre essas variantes
11 genéticas em pacientes com AR da população brasileira, considerada uma população
12 muito miscigenada.

13 Nosso estudo demonstra a importância de se avaliar o envolvimento das
14 Tregs e das variantes dos genes *TGFB1* e *IL10* na fisiopatologia e no curso clínico da
15 AR. Até onde temos conhecimento, esse é o primeiro estudo a demonstrar que os
16 níveis plasmáticos de TGF- β 1 podem ser modulados pela interação entre a variante
17 *TGFB1* +869 T>C e a presença de autoanticorpos. Além disso, as variantes +869 T>C
18 e -509 C>T do gene *TGFB1* podem prever atividade de doença moderada/grave em
19 diferentes subgrupos de pacientes com AR, de acordo com a positividade do FR. A
20 variante -592 C>A do gene *IL10* foi independentemente associada a maior frequência
21 de pacientes com FR positivo e, conseqüentemente, com pior prognóstico.

22 Uma das dificuldades no manejo da AR é o diagnóstico precoce e a
23 identificação de pacientes que irão evoluir com quadros mais graves da doença, ou
24 ainda, que não responderão adequadamente ao tratamento. Sendo assim, a
25 identificação de biomarcadores genéticos preditores de diagnóstico precoce e
26 prognóstico, pode contribuir para a escolha da melhor estratégia terapêutica visando
27 o controle da doença. A aplicação de tratamento individualizado com base em
28 características genéticas pode otimizar o cuidado à saúde do paciente, evitando
29 prescrições ineficazes e desperdício de recursos financeiros.

30

31

REFERÊNCIAS

- ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, 4, p. 130-6, 2005.
- ALAYLI, G. et al. Association of transforming growth factor β 1 gene polymorphism with rheumatoid arthritis in a Turkish population. **Joint Bone Spine**, v. 76, p. 20–23, 2009.
- ALETAHA, D. et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis Rheum**, 62, p. 2569-81, 2010.
- ALUNNO, A. et al. Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications. **Mediators Inflamm**, v. 2015, 751793, 2015.
- ANDERSON, J et al. Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of Rheumatology recommendations for use in clinical practice. **Arthritis Care Res** v. 64, p. 640-7, 2012.
- ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, 31, p. 315-24, 1988.
- ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 241-69, 2003.
- ATES, O. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. **Clinical Rheumatology**, v. 27, 1243, 2008.
- BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of transforming growth factor b in human disease. **N Engl J Med**, v. 342, p. 1350-8, 2000.
- BOERS, M. et al. Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 350, p. 309-18, 1997.
- BOWES, J.; BARTON, A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 4, p. 399-402, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide e Artrite diopática Juvenil. Brasília, DF, p. 212, 2020.
- BURDIN, N.; ROUSSET, F.; BANCHEREAU, J. B-cell-derived IL-10: production and function. **Methods**, v. 11, p. 98–111, 1997.

BURSKA, A.N. et al. Autoantibodies to posttranslational modifications in rheumatoid arthritis. **Mediat Inflamm**, v. 2014, p. 492873, 2014.

CAO, D. et al. CD25^{bright}CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. **Arthritis research & therapy**, v. 6, p. 335-46, 2004.

CAPASSO, M. et al. Cytokine gene polymorphisms in Italian preterm infants: association between interleukin-10-1082 G/A polymorphism and respiratory distress syndrome. **Pediatr. Res**, v. 61, p. 313-7, 2007.

CAZAC, B.B.; ROES, J. TGF- β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. **Immunity**, v. 13, p. 443 – 451, 2000.

CECCARELLI, F. et al. Porphyromonas gingivalis in the tongue biofilm is associated with clinical outcome in rheumatoid arthritis patients. **Clin Exp Immunol**, v. 194, p. 244-52, 2018.

CHANG, W.W. et al. Association between transforming growth factor-beta1 T869C polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, n. 4, p. 652-6, 2010.

CHEN, Z. et al. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 15, p. 9–17, 2019.

CHEN, Y. et al. Interaction between smoking and functional polymorphism in the TGFB1 gene is associated with ischaemic heart disease and myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. **Arthritis Res Ther**, v. 14, 2012.

CHUNG, F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon- γ . **Mediators of Inflammation**, v. 10, p. 51-9, 2001.

CICCACCI, C. et al. Polymorphisms in STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 and MIR146A genes are associated differently with prognostic factors in Italian patients affected by rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 186, p. 157–163, 2016.

CLARK, P. et al. Hydroxychloroquine compared with placebo in rheumatoid arthritis. A randomized controlled trial. **Ann Intern Med**, v. 119, p. 1067-71, 1993.

COUTANT, F. Pathogenic effects of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis – role for glycosylation. **Joint Bone Spine**, v. 86, p. 562-7, 2019.

CROIA, C. et al. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 37, p. 347-57, 2019.

CROSS, M. et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. **Ann Rheum Dis**, 2014;73(7):1316. Epub 2014 Feb 18.

DAR, L. et al. Are obesity and rheumatoid arthritis interrelated?. **Int J Clin Pract**, v. 72, 2018.

DAVIDSON, T. S. et al. Cutting edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. **J Immunol**, v. 178, p. 4022-6, 2007.

DEFRANCE, T. et al. Interleukin 10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 671–682, 1992.

DE RYCKE, L. et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. **Ann Rheum Dis**, v. 63, p. 1587-93, 2004.

DEJACO, C. et al. Altered T-cell subtypes in spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. **Rheumatology International**, v. 30, n. 3, p. 297-303, 2010.

DOMBRECHT, E. J. et al. Influence of anti-tumor necrosis factor therapy (Adalimumab) on regulatory T cells and dendritic cells in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 24, n. 1, p. 31–37, 2006.

EHRHARDT, R.O.; STROBER, W.; HARRIMAN, G.R. Effect of transforming growth factor TGF- β 1 on IgA isotype expression. TGF- β 1 induces a small increase in sIgA^b B cells regardless of the method of B cell activation. **J Immunol**, v. 148, p. 3830–3836, 1992.

ERIKSSON, J. K. et al. Incidence of rheumatoid arthritis in Sweden: a nationwide population-based assessment of incidence, its determinants, and treatment penetration. **Arthritis Care Res**, v. 65, p. 870-8, 2013.

FIRESTEIN, G. S. Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, in: G.S. Firestein, R.C. Budd, E.D.J. Harris, I.B. McInnes, S. Ruddy, J.S. Sargent (Eds.), **Kelley's Textbook of Rheumatology**, eighth ed. Saunders, Philadelphia, PA, 2009.

GAMBHIR, D. et al. Association of tumor necrosis factor alpha and IL-10 promoter polymorphisms with rheumatoid arthritis in North Indian population. **Rheumatology International**, v. 30, p. 1211–1217, 2010.

GARDETTE, A. et al. High anti-CCP antibody titres predict good response to rituximab in patients with active rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 81, n. 5, p. 416–20, 2014.

- GE, L. et al. Association between polymorphisms of interleukin 10 with inflammatory biomarkers in East Chinese Han patients with rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 82, p. 182-6, 2015.
- GOELDNER, I. et al. Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies with extra-articular manifestations, gender, and tabagism in rheumatoid arthritis patients from southern Brazil. **Clin Rheumatol**, v. 30, p. 975-80, 2011.
- GONZALO-GIL, E. et al. Transforming growth factor (TGF)- β signalling is increased in rheumatoid synovium but TGF- β blockade does not modify experimental arthritis. **Clin Exp Immunol**, v. 174, p. 245-55, 2013.
- GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 30, p. 1205-13, 1987.
- GRUTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 3-15, 2005.
- GUO, Q. et al. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. **Bone Res**, 2018.
- GUO, W. et al. Polymorphisms of transforming growth factor- β 1 associated with increased risk of gastric cardia adenocarcinoma in north China, *Int. J. Immunogenet*, v. 38, p. 215–224, 2011.
- HAJEER, A.H. et al. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 27, n. 2, p. 142–5, 1998.
- HAN, G. M. et al. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. **Cellular Immunology**, v. 253, n. 1-2, p. 92-101, 2008.
- HARMAN, H. et al. Comparison of fetuin-A and transforming growth factor beta 1 levels in patients with spondyloarthropathies and rheumatoid arthritis. **Int J Rheum Dis**, v. 20, p. 2020-27, 2017.
- HARRE, U. et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human auto-antibodies against citrullinated vimentin. **J. Clin. Invest**, v. 122, p. 1791-802, 2012.
- HASHEMI, V. et al. Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in Iranian population. **Immunology Letters**, v. 204, p. 16–22, 2018.
- HEE, C. S. et al. Comparison of single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-10 gene promoter between rheumatoid arthritis patients and normal subjects in Malaysia [published correction appears in *Mod Rheumatol*. 2007;17(6):534]. **Mod Rheumatol**, v. 17, p. 429-35, 2007.

HERNÁNDEZ-BELLO, J. et al. Aberrant expression of interleukin-10 in rheumatoid arthritis: relationship with IL10 haplotypes and autoantibodies. **Cytokine**, v. 95, p. 88-96, 2017.

HOLERS, V. M.; BANDA, N. K. Complement in the Initiation and Evolution of Rheumatoid Arthritis. **Front. Immunol**, v. 9, p. 1057, 2018.

HUNTER, T. M. et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004-2014. **Rheumatol Int**, v. 37, p. 1551-7, 2017.

HUSSEIN, Y.M. et al. Interaction between TGF- β 1 (869C/T) polymorphism and biochemical risk factor for prediction of disease progression in rheumatoid arthritis. **Gene**, v. 536, p. 393–397, 2014.

IMBODEN, J.B. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 417–34, 2009.

INGEGNOLI, CASTELLI, GUALTIEROTTI. Rheumatoid factors: clinical applications. **Dis Markers**, v. 35, n. 6, p. 727–34, 2013.

JEANNIN, P. et al. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **J Immunol**, v. 160, p. 3555– 3561, 1998.

JI, L. et al. A study on relationship among apoptosis rates, number of peripheral T cell subtypes and disease activity in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, 2013.

JIAO, Z. et al. Accumulation of FoxP3- expressing CD4⁺CD25⁺ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 36, n. 6, p. 428-33, 2007.

KANBE, K.; CHIBA, J.; NAKAMURA, A. Immunohistological analysis of synovium treated with abatacept in rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 33, n. 7, p. 1883–7, 2013.

KAWASHIRI, S. Y. et al. CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 12, p. 2517-21, 2011.

KEE, B.L.; RIVERA, R.R.; MURRE, C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF- β . **Nat Immunol**, v. 2, p. 242–247, 2001.

KEHRL, J.H. et al. Transforming growth factor- β suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. **J Immunol**, v. 146, p. 4016–4023, 1991.

KNEVEL, R.; HUIZINGA, T.W.J.; KURREEMAN, F. Genomic Influences on Susceptibility and Severity of Rheumatoid Arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 43, n. 3, p. 347-361, 2017.

KIM, S. Y. et al. TGF- β 1 polymorphism determines the progression of joint damage in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 33, p. 389-94, 2004.

KOBAYASHI, T. et al. Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. **J Periodontol**, v. 80, p. 792-9, 2009.

KOBAYASHI, T. et al. Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. **Journal of Periodontology**, v. 80, p. 92–799, 2009.

KORCZOWSKA, I. Rheumatoid arthritis susceptibility genes: An overview. **World J Orthop**, v. 5, p. 544-9, 2014.

LAWSON, C. A. et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell population in peripheral blood. **Rheumatology**, v. 45, p. 1210-7, 2006.

LEVY, Y.; BROUET, J.C. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. **J Clin Invest**, v. 93, p. 424–8, 1994.

LIN, Y.J.; ANZAGHE, M.; SCHÜLKE, S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for Rheumatoid Arthritis. **Cells**, v. 9, 2020.

LINDSAY, J. O.; HODGSON, H. J. Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10 – a therapy for Crohn's disease?. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, p. 1709-16, 2001.

LIU, M. -F. et al. The presence of cytokine-suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 3, p. 312-17, 2005.

LIU, Q. et al. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis and meta-regression. **Clin Rheumatol**, v. 37, p. 3229-37, 2018.

MACGREGOR, A. J. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, p. 30-37, 2000.

MALMSTROM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. **Nat Rev Immunol**, v. 17, p. 60–75, 2017.

MANEIRO, R.J. et al. Rheumatoid factor as predictor of response to abatacept, rituximab and tocilizumab in rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. **Semin Arthritis Rheum**, v. 43, n. 1, p. 9–17, 2013.

MARINO, I. et al. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 8, p. 2549-2556, 2007.

MATTEY, D.L. et al. Association of polymorphism in the transforming growth factor {beta}1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 64, n. 8, p.1190-1194, 2009.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 365, p. 2205-19, 2011.

MIELIAUSKAITE, D. et al. Relationship between serum levels of TGF-beta1 and clinical parameters in patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis. **Autoimmunity**, v. 42, p. 356-8, 2009.

MIJAC, D. et al. The Polymorphism rs3024505 (C/T) Downstream of the IL10 Gene Is Associated with Crohn's Disease in Serbian Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Tohoku J Exp Med**, v. 240, n. 1, p. 15-24, 2016.

MILMAN, N.; KARSH, J.; BOOTH, R. A. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Biochem**, v. 43, p. 1309-1314, 2010.

MORENO, O.M. et al. Polymorphisms of IL-10 gene promoter and rheumatoid arthritis in a Colombian population. **Biomédica**, v. 27, p. 56–65, 2007.

MOTA, L. M. H. et al. Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v. 53, n. 2, p. 141-157, 2013.

MOURA, M. C. et al. Perfil dos pacientes com manifestações extra-articulares de artrite reumatoide de um serviço ambulatorial em Curitiba, Sul do Brasil. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 5, p. 686-694, 2012.

MUNIZ, P. et al. An increased abundance of clostridiaceae characterizes arthritis in inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. **Inflamm Bowel Dis**, 2018.

MYASOEDOVA, E. et al. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. **Arthritis Rheum**, v. 62, p. 1576-82, 2010.

NIE, J. et al. FOXP3(+) Treg cells and gender bias in autoimmune diseases. **Front Immunol**, v. 6, 2015.

NIU, Q. et al. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 9, p. 2731-36, 2012.

O'SHEA, J. J. et al. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. **Ann Rheum Dis**, v. 72, p. 111-5, 2013.

OGAWA, Y.; DURU, E. A.; AMEREDES, B. T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. **Curr Mol Med**, v. 8, p. 437-45, 2008.

OKADA, Y. et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. **Nature**, v. 506, p. 376-81, 2014.

OKAMOTO, K. et al. Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. **Physiol. Rev**, v. 97, p. 1295-349, 2017.

PANOULAS, V.F. et al. Transforming growth factor-1 869T/C, but not interleukin-6 -174G/C, polymorphism associates with hypertension in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 48, p. 113–118, 2008.

PARADOWSKA-GORYCKA, A., et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Polish rheumatoid arthritis patients. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, p. 225–231, 2010.

PATEL, S.L.; PRAKASH, J.; GUPTA, V. TGF- β 1 +869C/T polymorphism increases susceptibility to rheumatoid arthritis in North Indian population. **Clinical Rheumatology**, p. 5–12, 2020.

PAULA, F. S.; ALVES, J. D. Non-tumor necrosis factor-based biologic therapies for rheumatoid arthritis: present, future, and insights into pathogenesis. **Biologics**, v. 8, p. 1-12, 2014.

PAWLIK, A. et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 24, p. 480–484, 2005.

PEREIRA, I. A. et al. National recommendations based on scientific evidence and opinions of experts on the use of methotrexate in rheumatic disorders, especially in rheumatoid arthritis: results of the 3E Initiative from Brazil. **Rev Bras Reumatol**, v. 49, p. 346-61, 2009.

PEREZ, L.; ORTE, J. A.; BRIEVA, J. Terminal differentiation of spontaneous rheumatoid factor-secreting B cells from rheumatoid arthritis patients depends on endogenous interleukin-10. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, p. 1771–1776, 1995.

PIEPER, J. et al. CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody- positive rheumatoid arthritis patients. **BMC Immunol**, v. 14, p. 34, 2013.

POKORNY, V. et al. Transforming growth factor β 1 gene (HSTGFB1) nucleotide T869C (codon 10) polymorphism is not associated with prevalence or severity of rheumatoid arthritis in a Caucasian population. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, p. 907–908, 2003.

PREVOO, M. L. et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 38, p. 44-8, 1995.

QU, C. H. et al. Diagnostic values of serum IL-10 and IL-17 in rheumatoid arthritis and their correlation with serum 14-3-3 η protein. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 23, p. 1899-906, 2019.

RAHMAN, E. A. et al. Interleukin-10, Interleukin-16 and Interferon- γ in serum of patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 20, p. 46-57, 2005.

RAMKUMAR, H. L. et al. IL-10 -1082 SNP and IL-10 in primary CNS and vitreoretinal lymphomas. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 250, p. 1541-48, 2012.

REPARON-SCHUIJT, C. C. et al. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, p. 41–47, 2001.

RÖNNELID, J. et al. Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: Anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. **Ann. Rheum. Dis**, v. 64, p. 1744-9, 2005.

ROUSSET, F. et al. Long- term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. **Int Immunol**, v. 7, p. 1243–53, 1995.

ROZMAN, B. Clinical pharmacokinetics of leflunomide. **Clin Pharmacokinet**, v. 41, p. 421-30, 2002.

RUPP, I. et al. Comorbidity in patients with rheumatoid arthritis: effect on health-related quality of life. **J Rheumatol**, v. 31, p. 58-65, 2004.

SAAD, M.N. et al. Genetic Case-Control Study for Eight Polymorphisms Associated with Rheumatoid Arthritis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, 2015.

SAAG, K.G. et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 59, n. 6, p. 762-84, 2008.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol**, v. 6, p. 345–52, 2005.

SALIM, P. H. et al. Interleukin-10 gene promoter and NFkB1 promoter insertion/deletion polymorphisms in systemic sclerosis. **Scand. J. Immunol**, v. 77, p. 162-8, 2013.

SANJABI, S.; OH, S.A.; LI, M. O. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 9, 2017.

SEMPERE-ORTELLS, J. M. et al. Quantification and phenotype of regulatory T cells in rheumatoid arthritis according to disease activity Score-28. **Autoimmunity**, v. 42, n. 8, p. 636-45, 2009.

SHAH, R. et al. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: Characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. **Human Genetics**, v. 119, p. 61–74, 2006.

SHENG, J.; CHEN, W.; ZHU, H. J. The immune suppressive function of transforming growth factor- β (TGF- β) in human diseases. **Growth Factors**, v. 33, p. 92-101, 2015.

SHRIVASTAVA, A. K. et al. Inflammatory markers in patients with rheumatoid arthritis. **Allergol Immunopathol**, v. 43, p. 81-7, 2015.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 388, p. 2023-38, 2016.

SOKOLOVE, J. et al. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v. 7, 2012.

SOKOLOVE, J. et al. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, p. 813-21, 2014.

SONG, G. G. et al. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta- analysis. **Hum. Immunol**, v. 74, p. 364-70, 2013.

SONG, H.Y. et al. Synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis induces alpha-smooth muscle actin in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through a TGF-beta1-dependent mechanism. **Exp Mol Med**, v. 42, p. 565–73, 2010.

SONG, Y.W.; KANG, E.H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. **QJM**, v. 103, n. 3, p. 139–46, 2010.

SUGIURA, Y. et al. Transforming growth factor β 1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, p. 826–828, 2002.

SUGIYAMA, D. et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. **Ann Rheum Dis**, v. 69, p. 70-81, 2010.

SUN, W. et al. Correlations between the polymorphism of +869T/C in TGF- β 1 and rheumatoid arthritis. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 19, p. 127–132, 2019.

TAN, E. M.; SMOLEN, J. S. Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. **J Exp Med**, v. 213, p. 1937-50, 2016.

TRAJKOV, D. et al. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. **Clinical Rheumatology**, v. 28, p. 1291–1300, 2009.

VAN AMELSFORT, J. M. R. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 9, p. 2775-85, 2004.

VAN DER WOUDE, D. et al. Gene-environment interaction influences the reactivity of autoantibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. **Nat. Genet**, v. 42, p. 814-6, 2010.

VAN ROON, J. A.; LAFEBER, F. P.; BIJLSMA, J. W. Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, p. 3-12, 2001.

VAN VLASSELAER, P.; PUNNONEN, J.; DE VRIES, J.E. Transforming growth factor- β directs IgA switching in human B cells. **J Immunol**, v. 148, p. 2062–2067, 1992.

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

VERNER, K.; SCHATZ, G. Protein translocation across membranes. **Science**, v. 241, n. 4871, p. 1307-1313, 1988.

VISSER K. et al. A matrix risk model for the prediction of rapid radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis receiving different dynamic treatment strategies: post hoc analyses from the BeSt study. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 7, p. 1333–7, 2010.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity, **J. Clin. Immunol**, v. 28, p. 647-59, 2008.

WANG, P.; ZHENG, S. G. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 6, p. 2668-74, 2013.

WANG, Y. et al. An Intrinsic Mechanism Predisposes Foxp3-Expressing Regulatory T Cells to Th2 Conversion In Vivo. **J Immunol**, v. 185, p. 5983–5992, 2010.

WARNER, G.L. et al. Anti-immunoglobulin treatment of murine B-cell lymphomas induces active transforming growth factor b but pRB hypophosphorylation is transforming growth factor b independent. **Cell Growth Differ**, v. 3, p. 175–181, 1992.

WARSTAT, K. et al. Transforming growth factor beta1 and laminin-111 cooperate in the induction of interleukin-16 expression in synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, p. 270-5, 2010.

WELLS, G. et al. Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. **Ann Rheum Dis**, v. 68, p. 954-60, 2009.

WILLEMZE, A. et al. The influence of ACPA status and characteristics on the course of RA. **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, n. 3, p. 144–52, 2012.

WILLIAMS, L. M. et al. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation – a continuing puzzle. **Immunology**, v. 113, p. 281-92, 2004.

YAMADA, Y. et al. Association of transforming growth factor beta1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 2, p. 452-460, 2000.

YING, B. et al. Association of polymorphisms in the human IL-10 and IL-18 genes with rheumatoid arthritis. **Mol Biol Rep**, v. 38, p. 379-85, 2011.

ZHANG, L. et al. Association of TGF-β1 +869C/T promoter polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 8, p. 4811-7, 2013.

ZHENG, S. G. et al. IL-2 is essential for TGF- beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. **J Immunol**, v. 178, p. 2018-27, 2007.

ZHOU, J. et al. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms and corresponding plasma levels with susceptibility to laryngeal squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 7, p. 1721-7, 2014.

ZHOU, T. B. et al. Association of transforming growth factor- β 1 T869C, G915C, and C509T gene polymorphisms with rheumatoid arthritis risk. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 34, p. 469-75, 2014.

ZHOU, Y.; SUN, M. A meta-analysis of the relationship between body mass index and risk of rheumatoid arthritis. **EXCLI J**, v. 17, p. 1079-89, 2018.

APÊNDICE A termo de consentimento livre e esclarecido

Título da pesquisa:

“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES E FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE”

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES E FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE”**, realizada no Hospital Universitário de Londrina (HU) da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é identificar os fatores de risco cardiovasculares em pacientes com artrite reumatoide (AR). A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: avaliação clínica pelo médico reumatologista e coleta de sangue. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é voluntária, podendo você: recusar-se a participar ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. **Serão realizados testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico e prognóstico de artrite reumatoide, determinação da atividade da doença, perfil metabólico, resposta imunológica, estresse oxidativo e outras análises que se façam necessárias.**

Os benefícios esperados são: 1) o conhecimento da prevalência de síndrome metabólica em pacientes com AR, de uma amostra da população brasileira, permite a estratificação de risco cardiovascular, o que implica em manejo mais adequado de acordo com as características da nossa população; 2) o entendimento da fisiopatologia que envolve as alterações do estresse oxidativo e inflamação na AR possibilita melhor monitoramento da doença e desenvolvimento de novas intervenções medicamentosas.

Informamos que o (a) senhor (a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar (médicas reumatologistas Neide Tomimura Costa – telefone 9921-9849 ou Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda telefone 9627-8181) ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, 60 ou no telefone 3371-2490 . Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, _____ de _____ de 2013.

_____(nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em
participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica) : _____

Eu, _____(nome do membro da equipe que
apresentou o TCLE), obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e
Esclarecido do sujeito da pesquisa para a sua participação na mesma.

(assinatura do membro da equipe que apresentou o TCLE)

Pesquisadores responsáveis

Prof. Dra Andréa Name Colado Simão

Prof. Dr. Isaias Dichi

APÊNDICE B

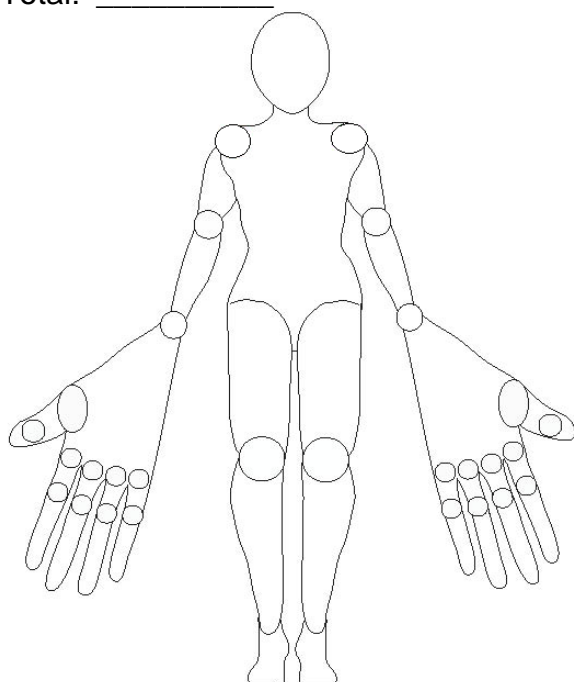
ficha de avaliação das28

NOME: _____

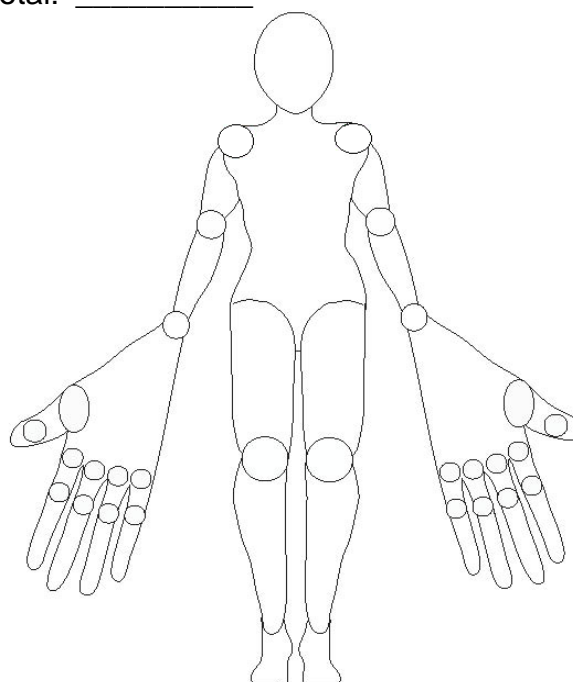
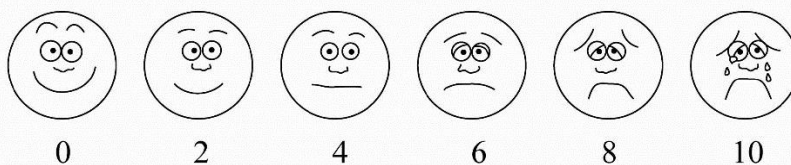
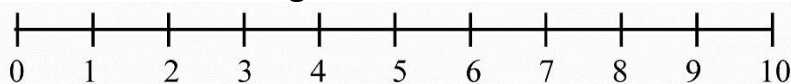
DATA DA VISITA: _____

ARTICULAÇÕES DOLOROSAS

Total: _____

**ARTICULAÇÕES EDEMACIADAS**

Total: _____

**Escala Visual Analógica Global:** _____**RESULTADOS LABORATORIAIS**

Data: _____
 VHS: _____ mm/h e/ou
 PCR: _____ mg/L

AVALIAÇÃO DO DAS

Cálculo do DAS 28 (VHS): _____ e/ou
 Cálculo do DAS 28 (PCR): _____

APÊNDICE C ficha de avaliação dos pacientes com artrite reumatoide

NOME: _____

RG: _____

IDADE ou DN: _____

SEXO: feminino () masculino ()

TEMPO DE DIAGNÓSTICO: _____

DAS 28: _____

COMPROMETIMENTO SISTÊMICO EXTRA-ARTICULAR:

pulmonar (), vasculite (), ocular (), nodulos reumatoides (), cardíaco (), SNC ()

OUTRAS DOENÇAS:

HAS (), DM (), dislipidemia (), IAM (), AVC (), outros: _____

outra colagenose (): _____

MEDICAÇÕES

() Prednisona dose: _____

() Metotrexate dose: _____

() Hidroxicloroquina/Cloroquina dose: _____

() Sulfassalazina dose: _____

() Leflunomide dose: _____

() Etanercepte dose: _____

() Adalimumabe dose: _____

() Infliximabe dose: _____

() Tocilizumabe dose: _____

() Abatacepte dose: _____

() Rituximabe dose: _____

() Ciclofosfamida dose: _____

() outros: _____

glibenclamida () / metformina () / insulina () / estatina ()

TABAGISMO: sim () não ()

ATIVIDADE FÍSICA: sim () não ()

tipo: _____ frequencia: _____ há quanto tempo: _____

DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Altura (cm)	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)	Circunf Abdominal (cm)	Pressão Arterial (mm/Hg)

ANEXO A Parecer do comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual De Londrina

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES E FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE.

Pesquisador: Andréa Name Colado Simão

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06405812.1.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 205.175

Data da Relatoria: 04/02/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto relevante do ponto de vista científico pois visa avaliar os fatores de risco de doença cardiovascular em pacientes com artrite reumatóide e a doença cardiovascular representa causa importante de mortalidade nestes pacientes. Da mesma forma, o conhecimento da frequência de síndrome metabólica e do estresse oxidativo nestes pacientes, poderão trazer subsídios importantes para o cuidado dos mesmos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o estresse oxidativo, os fatores de risco cardiovascular, prevalência de resistência insulínica e síndrome metabólica em pacientes com Artrite Reumatóide. Este estudo também propõem-se a avaliar se a presença de SM e/ou RI aumentam o estresse oxidativo em pacientes com artrite reumatóide.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Não há riscos aparentes para os pacientes uma vez que estes passarão por consulta especializada e coleta de sangue para exames que são rotina no seu atendimento. Idem para os controles que são doadores voluntários de sangue;
- não há benefício ou vantagem imediata inadequada para os participantes da pesquisa. Os resultados da pesquisa poderão trazer como benefícios, conhecimentos importantes para o tratamento de pacientes com artrite reumatóide.

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.038-440

Telefone: (43)3371-2490

E-mail: cep268@uel.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante do ponto de vista da ética em pesquisa e que teve as pendências levantadas na primeira análise pelo CEP resolvidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de rosto: adequada, assinada por uma das docentes participantes da pesquisa e por sua chefe de departamento;
- 2) Há o termo de concordância da Instituição Co-Participante (HU/UUEL): adequado;
- 3) TCLE: adequado para os pacientes e controles;
- 4) Cronograma: inadequado pois prevê a coleta de dados a partir de Novembro de 2012 mas foi colocada a ressalva de que a coleta de dados será iniciada apenas após a aprovação pelo CEP.

Recomendações:

- não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto passa a ser considerado aprovado após a regularização das pendências apontadas em análise prévia por este relator e pela plenária do CEP.

LONDRINA, 25 de Fevereiro de 2013

Assinador por:

**Paula Mariza Zedu Alliprandini
(Coordenador)**

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

CEP: 86.038-440

E-mail: cep268@uel.br