



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NEIDE TOMIMURA COSTA

**PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-  
ALFA) NO PROCESSO INFLAMATÓRIO, NO ESTRESSE  
OXIDATIVO E NA ATIVIDADE DA DOENÇA EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E  
RESISTÊNCIA À INSULINA**

NEIDE TOMIMURA COSTA

**PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-  
ALFA) NO PROCESSO INFLAMATÓRIO, NO ESTRESSE  
OXIDATIVO E NA ATIVIDADE DA DOENÇA EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E  
RESISTÊNCIA À INSULINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Isaias Dichi

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C837p Costa, Neide Tomimura.

Papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) no processo inflamatório, no estresse oxidativo e na atividade da doença em pacientes com artrite reumatoide e resistência à insulina / Neide Tomimura Costa. – Londrina, 2014.

80 f. : il.

Orientador: Isaias Dichi.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Artrite reumatoide – Teses. 2. Resistência à insulina – Teses. 3. Stress oxidativo – Teses. 4. Fator de necrose de tumor – Teses. I. Dichi, Isaias. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.72

NEIDE TOMIMURA COSTA

**PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-ALFA) NO  
PROCESSO INFLAMATÓRIO, NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA  
ATIVIDADE DA DOENÇA EM PACIENTES COM ARTRITE  
REUMATOIDE E RESISTÊNCIA À INSULINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Isaias Dichi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Name Colado Simão  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 09 de dezembro de 2014.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir e abençoar a realização deste trabalho.

À minha família, que me apoiou e muitas vezes sacrificou preciosos momentos de convivência.

Aos nossos pacientes, que aceitaram participar deste trabalho muitas vezes na esperança de melhorar o tratamento de sua doença e em outras simplesmente para colaborar com o nosso estudo.

Ao meu orientador, professor dr. Isaias Dichi, pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, pela preciosa orientação no trabalho, desde a elaboração do manuscrito até a orientação das aulas.

Agradeço à professora Dra. Andréa Name Colado Simão, exemplo de persistência, determinação e competência, pela oportunidade, paciência, compreensão, dedicação e empenho na orientação deste trabalho.

Ao professor dr. Vinicius Daher Alvares Delfino, que aceitou participar da banca e trouxe valiosa colaboração ao trabalho e artigo científico.

À grande parceira neste trabalho, Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda, que incentivou-me a começar e contagiou com toda alegria que lhe é peculiar.

Agradeço ao trabalho em conjunto do grupo de pesquisa do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologia do HU de Londrina, especialmente às doutorandas Ana Paula Kallaur e Francieli Delongui, que participaram das coletas e realização dos testes; ao pessoal da sala de coletas do AHC, que sempre esteve disposto a colaborar, ainda que trouxéssemos algum transtorno à rotina do setor.

Aos professores e médicos residentes da disciplina de Reumatologia pelo apoio e incentivo a estudar.

À Universidade Estadual de Londrina e aos dedicados professores doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde que possibilitam o crescimento pessoal e profissional de tantos alunos.

COSTA, NT. **Papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) no processo inflamatório, no estresse oxidativo e na atividade da doença em pacientes com artrite reumatoide e resistência à insulina.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

A inflamação sistêmica crônica e o estresse oxidativo têm sido propostos como principais protagonistas na patogênese da resistência à insulina (RI) em pacientes com artrite reumatóide (AR). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) desempenha um papel central na patogênese da AR e também tem sido implicado no desenvolvimento de RI e aumento do estresse oxidativo. **Objetivo:** Avaliar o envolvimento do TNF- $\alpha$  e RI sobre o processo inflamatório, estresse oxidativo e atividade da doença em pacientes com AR. **Métodos:** Este estudo caso-controle incluiu 270 sujeitos (grupo controle, n= 97; pacientes com AR, n=173). Pacientes com AR foram divididos em dois grupos: sem RI (IR-) e com IR (IR+). Depois disso, os pacientes com AR foram divididos em quatro grupos: o primeiro grupo sem IR e que não utilizavam terapia anti-TNF- $\alpha$  (G1, RI-TNF-); o segundo grupo, sem RI e que utilizavam anti-TNF- $\alpha$  (G2, RI-TNF +); o terceiro grupo, com RI e que não utilizavam anti-TNF- $\alpha$  (G3, IR + TNF-) e o quarto grupo, com RI e que utilizavam anti-TNF- $\alpha$  (G4, RI+TNF+). Foram realizadas medidas antropométricas, testes bioquímicos, imunológicos e parâmetros de estresse oxidativo. **Resultados:** o grupo RI+ apresentou maior *disease activity score evaluating 28 joints* (DAS28) (p = 0,043) com maior frequência de pacientes com alta atividade da doença, maior velocidade de hemossedimentação (p = 0,023), proteína C reativa (p = 0,040), níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  (p <0,05), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) (p <0,0001), índice pró-oxidante / antioxidante (PAI) (p <0,001) e menor *total radical-trapping antioxidant parameter* (TRAP) (p <0,05) em relação ao grupo RI-. G3 e G4 tinham (p <0,05) maiores AOPP e PAI em relação ao G1. Grupo G4 apresentou maior (p <0,05) AOPP e PAI do que G2. TRAP foi significativamente menor no G3 em relação ao G1. Níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores em G4 e G2 em comparação com G1 (p <0,0001) e G3 (p <0,0001 e p <0,01, respectivamente). **Conclusão:** A presença concomitante do TNF- $\alpha$  e RI é um fator importante envolvido no desequilíbrio redox em pacientes com AR e parece ser responsável pela manutenção do estado inflamatório e atividade da doença. A compreensão das complexas interações entre estresse oxidativo, TNF- $\alpha$  e RI pode permitir o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para a AR.

**Palavras-chave:** Artrite reumatoide. Resistência à insulina. Estresse oxidativo. DAS28. Terapia anti-TNF $\alpha$ .

COSTA, NT. **Role of Tumor Necrosis Factor-alpha on the Inflammatory Process, Oxidative Stress and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis and Insulin Resistance.** Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

**Introduction:** Systemic chronic inflammation and oxidative stress have been proposed as major protagonists in the pathogenesis of insulin resistance (IR) in patients with rheumatoid arthritis (RA). Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) plays a central role in the pathogenesis of RA and has also been implicated in the development of IR and oxidative stress increase. **Objective:** To evaluate the involvement of TNF- $\alpha$  and IR on the inflammatory process, oxidative stress and disease activity in patients with RA. **Methods:** This case-control study included 270 subjects (control group, n= 97) and RA patients (n = 173). RA patients were divided into two groups: without IR (IR-) and with IR (IR+). After that, RA patients were divided into four groups: the first group without IR and not using anti-tumor necrosis factor (TNF) alpha (G1, IR- TNF-); the second group without IR and using anti-TNF- $\alpha$  (G2, IR- TNF+); the third group with IR and not using anti-TNF- $\alpha$  (G3, IR+ TNF-) and the fourth group with IR and using anti-TNF- $\alpha$  (G4, IR+ TNF+). Anthropometric, biochemical, immunological and oxidative stress parameters were measured. **Results:** IR+ group had an increased disease activity score 28 (p=0.043) with enhanced frequency in patients with high disease activity, higher erythrocyte sedimentation rate (p=0.023), CRP (p=0.040), plasma TNF- $\alpha$  levels (p< 0.05), advanced oxidation protein products (AOPPs) (p<0.0001), pro-oxidant/antioxidant index (PAI) (p<0.001) and lower total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) (p< 0.05) in relation to the IR- group. G3 and G4 had higher (p<0.05) AOPPs and PAI compared to G1. G4 group presented higher (p< 0.05) AOPPs and PAI than G2. TRAP was significantly lower in G3 compared to G1. Plasma TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in G4 and G2 compared to G1 (p< 0.0001) and G3 (p< 0.0001 and p< 0.01, respectively). **Conclusion:** The concomitant presence of TNF- $\alpha$  and IR are important factors involved in redox imbalance in patients with RA and it seems to be due to the maintenance of inflammatory state and disease activity. An understanding of the complex interactions of oxidative stress, TNF- $\alpha$  and IR might allow the development of novel therapeutic targets for RA.

**Key-words:** Rheumatoid arthritis. Insulin resistance. Oxidative stress. Anti-TNF $\alpha$  therapy. Disease activity score.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Interação das vias de inflamação e sinalização da insulina .....18
- Figura 2** – Regulação das vias do HIF-1 (*hypoxia-inducible factor*) e NF- $\kappa$ B (fator nuclear capa-B) por espécies reativas de oxigênio e estimulação por citocinas.....23
- Figura 3** – Representação esquemática da superprodução de oxidantes derivados da NADPH oxidase e de fontes mitocondriais.....25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Critérios de classificação do ACR/EULAR 2010 para artrite reumatoide .....	13
<b>Tabela 2</b> – Classificação da atividade da doença de acordo com os critérios propostos pelo <i>Disease Activity Score evaluating 28 joints (DAS 28)</i> .....	14

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ANG II	angiotensina II
Anti-CCP	anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico
AOPP	produtos avançados da oxidação proteica
APC	célula apresentadora de antígeno
AR	artrite reumatoide
AT1R	receptor de angiotensina tipo 1
CAT	catalase
CL-LOOH	<i>tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence</i>
DAS	<i>disease activity score</i>
DCV	doença cardiovascular
DMARD	<i>disease-modifying antirheumatic drugs</i>
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FR	fator reumatoide
FSIVGTT	teste de tolerância endovenoso à glicose com amostras frequentes
GLUT-4	transportador de glicose 4
GSH-PX	glutaciona-peroxidase
GSHRd	glutaciona-redutase
HIF-1 $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor-1 alpha</i>
HLA	antígeno leucocitário humano
HOMA-IR	modelo de avaliação da homeostase - resistência à insulina
HOMA- $\beta$	modelo de avaliação da homeostase – função da célula beta
IL-17	interleucina-17
IL-6	interleucina-6
IMC	índice de massa corpórea
IRS-1	substrato do receptor de insulina 1
LES	lúpus eritematoso sistêmico
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDA	malondialdeído
MPPs	metaloproteinases
NF- $\kappa$ B	fator nuclear capa-B
NO	óxido nítrico

Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
OPG	osteoprotegerina
PAI	<i>pro-oxidant / antioxidante index</i>
PCR-us	proteína C reativa ultra-sensível
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PPAR- $\gamma$	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
QL	quimiluminescência
QUICKI	índice de verificação quantitativo de sensibilidade à insulina
RANK	ativador do receptor do fator nuclear capa B
RANKL	ligante do receptor do ativador do fator nuclear capa B
RI	resistência à insulina
RLU	<i>relative luminescence units</i>
SOD	superóxido-dismutase
TCR	receptor de célula T
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
TRAP	<i>total radical-trapping antioxidant parameter</i>
VHS	velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
1.1	Artrite reumatoide	12
1.2	Resistência à insulina	17
1.2.1	Resistência à insulina e artrite reumatoide	19
1.2.2	Implicações da presença de RI na AR	20
1.3	Estresse oxidativo	20
1.3.1	Estresse oxidativo e artrite reumatoide	22
1.4	Estresse oxidativo e RI	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	26
3.1	Delineamento do estudo	26
3.2	População	26
3.2.1	Crterios de inclusão	26
3.2.2	Crterios de exclusão	26
3.3	Determinações Antropométricas	27
3.4	Análises Bioquímicas e Imunológicas	27
3.5	Avaliação do estresse oxidativo	27
3.5.1	Capacidade Antioxidante Total Plasmática	27
3.5.2	Determinações de Produtos Avançados da Oxidação Protéica (AOPP)	28
3.5.3	Quimiluminescência induzida por t-Butil Hidroperóxidos	28
3.5.5	Índice pró-oxidante / antioxidante (PAI)	29
3.6	Análise Estatística	29
<b>4</b>	<b>ARTIGO: Role of tumor necrosis factor alpha on the inflammatory Process, Oxidative Stress and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis and Insulin Resistance</b>	30
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	52
	<b>REFERÊNCIAS</b>	53

<b>ANEXO A</b> – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina .....	59
<b>ANEXO B</b> – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	61
<b>ANEXO C</b> – Ficha de avaliação dos pacientes.....	63
<b>ANEXO D</b> – Modelo de avaliação do DAS28 (disease activity score).....	64
<b>ANEXO E</b> – Instruções para autores da revista Arthritis Research & Therapy .....	65

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Artrite reumatoide

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica, autoimune, que se caracteriza pelo acometimento das articulações sinoviais, principalmente mãos, de forma crônica e com potencial destrutivo e incapacitante [1]. É considerada a artropatia crônica de origem autoimune mais comum. Pode cursar com febre, anemia, perda de peso, acometimento pulmonar, ocular, cutâneo e vascular entre outros. Outrora designada como doença de etiologia desconhecida, tem se tornado protótipo para aplicação do conhecimento da patogênese molecular para o desenvolvimento de novos tratamentos [2].

A incidência varia entre 16,5 e 38 casos por 100.000 habitantes. A prevalência na maioria dos grandes estudos populacionais variou entre 0,2 a 1,1 por cento. Há grandes diferenças entre as populações estudadas: até 5,3% entre os índios PIMA na América do Norte e baixa ocorrência foi relatada em países da África, China e Japão. Dados da população brasileira são semelhantes à literatura mundial: AR atinge cerca de 1% da população adulta predominantemente mulheres na razão de 3 a 4:1 [3].

O diagnóstico é feito com base no quadro clínico e laboratorial e, algumas vezes, pode oferecer dificuldades, principalmente nos casos em que a apresentação clínica inicial não é a forma classicamente descrita de AR: o paciente pode apresentar artrite não simétrica, em uma única ou poucas articulações e em cerca de 20% dos casos o fator reumatoide (FR) e anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) estão ausentes. Para a inclusão de um paciente em estudo científico e também auxiliar no estabelecimento do diagnóstico do paciente individual são utilizados critérios de classificação. Atualmente o diagnóstico de AR é baseado em critérios classificatórios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) / Liga Européia Contra o Reumatismo (EULAR) de 2010 que compreendem 4 domínios: número e tipo das articulações afetadas, presença de FR e/ou anti-CCP, proteínas de fase aguda (velocidade de hemossedimentação - VHS e proteína C reativa - PCR) e duração dos sintomas. Para cada item é atribuído um escore e se a somatória final for maior ou igual a seis indica AR definida. Estes critérios podem ser aplicados a qualquer paciente que apresente pelo menos uma articulação edemaciada, para a qual outra doença não seja a causa mais provável [4]. Os critérios ACR/EULAR 2010 têm maior sensibilidade e permitem o diagnóstico em uma fase mais precoce que os anteriormente utilizados, visto que não contam mais com a presença de erosões articulares e nódulos subcutâneos, achados pouco encontrados em fases iniciais da doença.

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

<b>Envolvimento articular</b>	
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 1 pequena articulação)	5
<b>Sorologia</b>	
FR negativo e AACP negativos	0
FR positivo em título baixo ou AACP positivo em título baixo	2
FR positivo em título alto ou AACP positivo em título alto	3
<b>Provas de fase aguda (pelo menos 1 é requerida)</b>	
PCR normal e VHS normal	0
PCR anormal ou VHS anormal	1
<b>Duração dos sintomas</b>	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

AR definida: ≥ 6 pontos; VHS=velocidade de hemossedimentação; PCR =proteína C reativa; FR= fator reumatoide; AACP= anticorpos anti proteína/peptídeos citrulinados; ACR= American College of Rheumatology; EULAR: European League Against Rheumatism  
 Fonte: Aletaha, 2010

Por outro lado, o índice de atividade de doença DAS28 (*Disease Activity Score 28*) consiste em contagem articular de 28 articulações (interfalangianas proximais, metacarpofalangianas, punhos, cotovelos, ombros e joelhos, bilateralmente) e determinam um valor numérico para atividade da AR. As definições de doença em remissão, baixa atividade, moderada atividade e alta atividade referem-se aos valores obtidos com o índice DAS 28.

**Tabela 2** – Classificação da atividade da doença de acordo com os critérios propostos pelo *Disease Activity Score 28* (DAS 28)

<b>Estado de atividade</b>	<b>DAS28</b>
Remissão	≤2,6
Baixa	≤3,2
Moderada	≤5,1
Alta	>5,1

Fonte: Prevoo, 1995

Sua etiologia é complexa e multifatorial, não totalmente esclarecida. Entende-se que fatores ambientais num indivíduo geneticamente susceptível podem desencadear a doença. Dentre os fatores ambientais, o tabagismo é o fator de risco mais bem estabelecido. Outros, como exposição à sílica, óleos minerais, carvão, agentes infecciosos como vírus Epstein-Baar, citomegalovírus, espécies de proteus e *Escherichia coli* tem sido descritos. AR tem sido associada também a doenças periodontais (*Porphyromonas gingivalis*) [5]. Há uma associação bem estabelecida com o antígeno leucocitário humano (HLA) –DRB1 em pacientes positivos para FR ou anti-CCP. A presença do epítipo compartilhado (alelos que contém a sequência de aminoácidos QKRAA na região do HLA-DRB1) confere particular susceptibilidade. Outros genes identificados que têm fortes evidências de associação com AR são PTPN22, TRAF1-C5 locus, OLIG3 – AIP3locus, STAT4 [2]. Vários outros genes tem sido estudados na patogênese da AR: AFF3, CD28, CTLA4, PRKCQ, REL, TNFAIP3 entre outros. Fatores genéticos de risco para doença anti-CCP negativa parece ser menos importante que na doença anti-CCP positiva [5].

Existe uma fase antes do aparecimento clínico da doença na qual a resposta imune se desenvolve. O modelo de patogênese mais aceito atualmente supõe que o fumo, no indivíduo geneticamente suscetível, leve a modificação de proteínas. Nos pulmões, a exposição ao tabaco leva à síntese e ativação de enzimas chamadas peptidil arginina deaminases, que causam citrulinização (mudança de um aminoácido arginina para citrulina), formando um neoepítipo. Este último desencadeia a produção de anticorpos anti-proteínas citrulinadas (anti-CCP) que pode estar presente no soro até dez anos antes da manifestação de doença.

A fase de artrite se inicia com a infiltração de leucócitos na sinóvia devido à ativação endotelial, que aumenta a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. As células apresentadoras de antígeno (APC) apresentam o antígeno ao linfócito T pela interação do MHC com o receptor de célula T (TCR). A ativação do linfócito T somente ocorre após um sinal coestimulador mediado pela interação do CD28 no linfócito T com CD80/86 na APC. As funções da célula B são apresentação de antígeno e produção de anticorpos. O macrófago ativado pela célula T ou por imunocomplexos produz

muitas citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) -1 e IL-6, que aumentam a expressão de moléculas de adesão. A célula T ativada pode diferenciar-se em vários fenótipos, como T-helper 17 (Th17) , que são dependentes da estimulação pela IL-6 e produzem IL-17. Esta última aumenta a liberação de citocinas que destroem a cartilagem e a expressão de moléculas relacionadas com a reabsorção óssea, como ligando do ativador do receptor do fator nuclear *kappa B* (RANKL) [2].

Condições de hipóxicas e citocinas estimulam a neoangiogênese e a linfangiogênese insuficiente limita o egresso celular, permitindo o acúmulo de leucócitos. Ocorre profunda alteração estrutural na sinóvia e ativação local de fibroblastos, o que caracteriza o tecido inflamatório sinovial (pannus) . Este tecido se infiltra na cartilagem articular; citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-17 agem sinergicamente para liberar metaloproteases da matriz (MPPs) por fibroblastos e macrófagos. São conhecidas pelo menos 19 MPPs , das quais MPP1 e MPP3 tem papel importante na AR. As MPP são capazes de degradar todas as proteínas estruturais na matriz extracelular da cartilagem. Além da invasão de toda a articulação, o pannus também invade outros tecidos, como ligamentos, tendões e ossos.

O desenvolvimento de erosões ósseas ocorre precocemente na AR. A reabsorção óssea é mediada pelos osteoclastos, que são ativados pelo RANKL, que é uma proteína transmembranar produzida pelos osteoblastos. Esta se liga ao receptor ativador do fator nuclear *kappa B* (RANK), presente no precursor do osteoclasto, promovendo a maturação do osteoclasto. Em pacientes com AR, o RANKL é produzido também pela célula T ativada e por células sinoviais fibroblasto-like por TNF $\alpha$ , IL-1 e provavelmente IL-6.

Este processo é antagonizado pela osteoprotegerina (OPG), uma proteína solúvel da superfamília do receptor de TNF, que funciona como um receptor de RANKL, sendo capaz de inibir a produção de osteoclastos. Na AR há um desequilíbrio entre RANKL e OPG que favorece a reabsorção óssea, formando as erosões.

O aumento das doenças cardiovasculares, incluindo infarto do miocárdio, eventos cerebrovasculares e falência cardíaca, ocorre como consequência da inflamação sistêmica da AR. Este aumento nas taxas não são explicados pelos tradicionais fatores de risco, uso de glicocorticóides ou anti-inflamatórios não hormonais nem por causas genéticas [6]. A inflamação sistêmica – citocinas (IL-6 e TNF $\alpha$ ), reagentes de fase aguda, imunocomplexos e partículas de lipídeos alteradas (como o amilóide sérico rico em HDL) - aumenta a ativação endotelial e instabiliza a placa de ateroma. Citocinas tornam o tecido muscular e adiposo resistentes à insulina, resultando em uma síndrome “metabólica inflamatória”. Além disso, o risco vascular está aumentado precocemente no curso da AR, o que pode ser reflexo da inflamação subclínica da fase pré-articular.

A maioria dos pacientes apresenta início insidioso, com dor e edema articular, rigidez matinal e alguns sintomas sistêmicos com fadiga, ocasionalmente febre baixa. Perda de peso significativa é

incomum. As articulações mais envolvidas são as metacarpofalangeanas (MCF), interfalangeanas proximais (IFD), metatarsofalangeanas (MTF), punhos, joelhos, cotovelos, tornozelos, quadris e ombros em ordem decrescente de frequência. Quase sempre poupa as interfalangeanas distais (IFD). Pode afetar qualquer articulação sinovial. Classicamente o acometimento é simétrico e também há simetria na mesma articulação (lado medial e lateral de joelhos, por exemplo). Acometimento de articulação temporomandibular, cricoaritenóide e/ou esternoclavicular costuma ocorrerem somente na doença avançada.

As manifestações extra-articulares podem ocorrer em até 40% dos pacientes em algum momento da doença. Consistem em nódulos reumatóides, síndrome de Sjögren secundária, pericardite, pleurite, fibrose pulmonar, vasculite cutânea, glomerulonefrite, neuropatia relacionada à vasculite, síndrome de Felty, esclerite, episclerite, bronquiolite obliterante e amiloidose. O acometimento sistêmico está associado à pior prognóstico, especialmente a vasculite e a doença pulmonar reumatóide [7].

Os exames laboratoriais podem revelar anemia de doença crônica, e o grau de anemia varia de acordo com a atividade da doença. Pode haver aumento da contagem de leucócitos e trombocitose. Velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa (PCR) estão elevadas na doença em atividade. Quando persistentemente elevadas associa-se a mau prognóstico. Fator reumatóide é encontrado em 50% dos casos na apresentação da doença e cerca de 20 a 35% tornam-se positivos nos seis primeiros meses após o diagnóstico. Anti-CCP estão presentes em 60-70% dos pacientes com AR e tem especificidade de 90-98%. Podem estar presentes no soro vários anos antes da doença aparente e têm correlação com doença erosiva. A sua utilidade como marcador de atividade da doença é controversa [8–11].

O tratamento da AR deve ser iniciado tão logo o diagnóstico seja estabelecido. Existe uma “janela de oportunidade” para o tratamento da AR, que é o período de tempo em que o início do tratamento adequado pode mudar a evolução da doença, evitando o dano articular irreversível. A terapia deve objetivar a remissão da doença e a escolha da terapêutica medicamentosa deve ser baseada em critérios de prognóstico da doença – são critérios de mau prognóstico a presença de FR ou anti-CCP em títulos elevados, presença de acometimento extra-articular, erosões ósseas nas radiografias e limitação funcional. Os glicocorticóides são utilizados em baixa dose, promovem grande alívio da dor e podem diminuir a progressão radiográfica da doença. Recomenda-se que sejam utilizados por curto período e não devem ser utilizados em monoterapia. Anti-inflamatórios não hormonais e analgésicos são utilizados para o alívio da dor, mas não interferem na progressão da AR. As drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs) utilizadas no Brasil são metotrexato (primeira escolha), hidroxicloroquina, sulfassalazina e leflunomida. Ciclosporina e azatioprina são utilizadas se houver acometimento extra-articular grave. Sais de ouro (aurotiomalato e aurotioglicose) na forma injetável são opções pouco utilizadas devido aos efeitos adversos e dificuldade de aquisição

no Brasil [12]. Agentes biológicos foram desenvolvidos especificamente para inibir determinadas citocinas ou grupos celulares. Existem no mercado atualmente os anticorpos anti-fator de necrose tumoral alfa (anti-TNF $\alpha$ ) infliximabe, adalimumabe, etanercepte, certolizumabe e golimumabe; anticorpo que depleta células B CD20+ rituximabe; inibidor da co-estimulação da célula T abatacepte e bloqueador do receptor da IL-6 tocilizumabe. No Brasil, a indicação de um agente biológico está vinculada a falha de um ou mais DMARDs segundo recomendações do Consenso Brasileiro para Tratamento da AR [12].

## 1.2 Resistência à insulina

Resistência à insulina (RI) é definida como um estado patológico em que ocorre uma resposta menor do que a esperada à concentração sérica normal de insulina, resultando em hiperinsulinemia compensatória, com níveis de glicemia normais ou elevados [13]. Estudo realizado em americanos não-diabéticos e sem intolerância a glicose, entre 1999 e 2002, mostrou que a RI tinha prevalência de 30,6% e estava fortemente associada ao índice de massa corpórea [14]. Associa-se frequentemente a outras comorbidades como doença cardiovascular, obesidade, hipertensão, além de ser causa importante de diabetes mellitus tipo 2 .

As principais causas de RI podem ser divididas em 3 grupos: 1- decorrentes de mutações genéticas no receptor de insulina (Leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, síndrome da resistência à insulina tipo A); 2- RI secundária (obesidade, excesso de hormônios contra-regulatórios como glicocorticóides, catecolaminas e hormônio do crescimento, sedentarismo, estresse e infecção, imunomediada por anticorpos anti-insulina, anti-receptor de insulina), miscelânea (uremia, cirrose, cetoacidose); 3- RI de etiologia multifatorial (hipertensão, síndrome do ovário policístico, síndrome metabólica e a maioria dos casos de diabetes tipo 2) [15] .

A inflamação de baixo grau relacionada à obesidade é uma importante causa de RI. Uma teoria atualmente aceita é a de que a expansão do tecido adiposo leva à hipertrofia e hiperplasia de adipócitos, causando hipóxia celular, com ativação de vias celulares de estresse. Ocorre então inflamação e liberação de citocinas. Macrófagos são atraídos, liberam citocinas exacerbando o processo inflamatório e a RI. No fígado, as células de Kupffer, que são macrófagos teciduais, tornam-se ativadas liberando citocinas localmente, o que exacerba a inflamação e a RI hepática. O aumento de ácidos graxos livres circulantes e nos tecidos pode ativar respostas inflamatórias nas células endoteliais, adipócitos e derivados de células mielóides. O resultado destes eventos fisiológicos desencadeados pela obesidade é o desenvolvimento de inflamação sistêmica. TNF $\alpha$  secretado por monócitos e macrófagos tem amplos efeitos biológicos sobre o metabolismo de lipídeos, coagulação e função endotelial. A ativação do receptor de TNF $\alpha$  prejudica a fosforilação do receptor do substrato 1 da insulina (IRS-1). Além disso, o TNF $\alpha$  pode afetar a sinalização da insulina por meio da diminuição

na expressão gênica do receptor de insulina, IRS-1 e transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) [16] (figura 1).

Os adipócitos produzem hormônios metabolicamente ativos que podem afetar a sensibilidade à insulina. Adipocinas mais importantes são: leptina, adiponectina, resistina e visfatina. As concentrações de leptina, resistina e visfatina são associadas à inflamação, resistência à insulina e risco cardiovascular. Ao contrário, adiponectina é anti-inflamatória e inversamente relacionada com obesidade, resistência à insulina e risco cardiovascular [17].

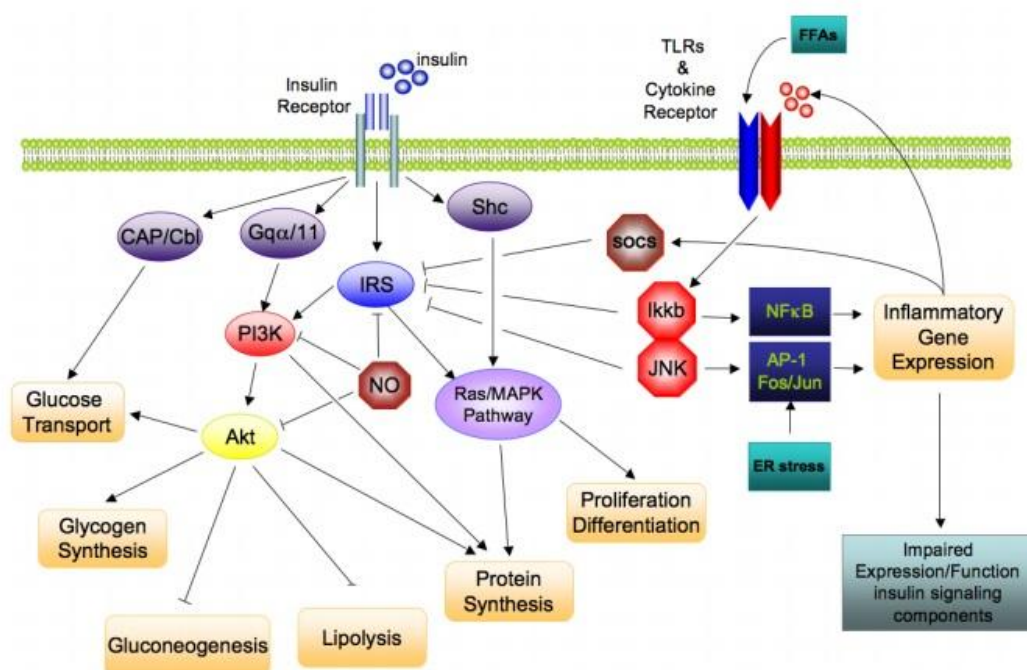


Figura 1: Interação das vias de inflamação e sinalização da insulina

A cascata de sinalização da insulina tem duas vias principais. A via PI3K/AKT medeia ação da insulina no metabolismo dos nutrientes, incluindo a captação de glicose. A via Ras/MAPK medeia o efeito da insulina na expressão gênica, mas também interage com a via PI3K-AKT para controlar o crescimento e diferenciação celular. Ativação do receptor de insulina leva a fosforilação da tirosina do IRS1, iniciando a transdução. Estimulação do NFκB e da via de inflamação AP-1 Fos/Jun resulta na ativação de serina quinases, IκB e Jnk1, as quais reduzem a habilidade de sinalização do IRS1. Contra-reguladores do IRS incluem Socs e óxido nítrico, que são induzidos na inflamação e promovem degradação do IRS. Óxido nítrico também reduz atividade PI3K/Akt por s-nitrosilação do Akt.

Fonte: Adaptado de Luca, 2009

A medida da resistência à insulina pode ser realizada por métodos diretos ou indiretos. O Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA) é um modelo matemático que prediz a resistência à insulina (HOMA-IR) ou a função da célula β pancreática (HOMA-β) tendo como parâmetros a insulinemia e a glicemia de jejum. O modelo fornece o índice HOMA-IR pela seguinte equação:  $HOMA-IR = \text{glicemia (mMol)} \times \text{insulina (uU/mL)} / 22,5$  e  $HOMA-\beta : (20 \times \text{insulina de jejum})$

(mU/L)/( glicemia de jejum (mmol/L)– 3,5) [18]. O índice HOMA-IR tem boa correlação com o método padrão-ouro para avaliação de resistência à insulina, o *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico [19,20].

### 1.2.1 Resistência à insulina e artrite reumatoide

Na AR, a resposta inflamatória sistêmica contribui para a aterosclerose acelerada. Citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, produzidas no tecido sinovial, podem ser liberadas na circulação sistêmica gerando um espectro de modificações pró-aterogênicas que incluem disfunção endotelial, RI, dislipidemia característica, efeitos pró-trombóticos e pró estresse oxidativo [21].

Está bem estabelecido que há aumento da RI na AR. As hipóteses para explicar essa associação são: 1<sup>a</sup>) a inflamação crônica, que pode diminuir a função das células beta pancreáticas e desencadear um estado de RI; 2<sup>a</sup>) o TNF $\alpha$ , importante citocina na patogênese da AR e mediadora da RI em obesos e diabéticos por impedir a captação de glicose pelo músculo esquelético. O TNF $\alpha$  pode agir no receptor de insulina, impedindo a transdução do sinal e inibir genes como os de transcrição do GLUT4 [16] e inibir a atividade de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) [22]; 3<sup>a</sup>) pacientes com AR, devido à caquexia reumatoide, têm maior obesidade abdominal mesmo quando comparados a grupos com mesmo IMC [23]; 4<sup>a</sup>) aumento dos fatores de risco tradicionais como obesidade e inatividade [24]. Por outro lado, os corticosteróides causam intolerância à glicose e poderiam ser, pelo menos em parte, responsáveis pela RI na AR. Contudo, vários estudos verificaram somente uma discreta ou inexistente relação entre síndrome metabólica e/ou RI com o uso de corticosteróides nos pacientes com AR. Estes dados sugerem que o benefício que o corticóide traz controlando a inflamação contrapõe-se ao seu efeito metabólico maléfico sobre a RI [25, 26].

Um dos primeiros estudos a mostrar a associação entre AR e RI envolveu 94 pacientes com AR e estudou a RI pelos índices de HOMA-IR e HOMA- $\beta$ ; concluiu que a RI estava associada aos marcadores da inflamação (VHS e PCR) e atividade da doença medida pelo DAS-28, além de fatores já conhecidos como circunferência abdominal, hipertensão arterial e uso de diuréticos e beta-bloqueadores. O DAS-28 correlacionou-se principalmente com HOMA- $\beta$  [23]. Outros estudos posteriores foram concordantes na associação de RI e AR, relacionando-a aterosclerose subclínica e dose de esteróide [27]. Chung et al [24] compararam 104 pacientes com AR e 104 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e concluíram que os pacientes com AR tem HOMA maior que os pacientes com LES, mesmo quando ajustados para idade, gênero e uso de esteróide; a seguir, correlacionaram HOMA com IL-6, TNF $\alpha$ , PCR, VHS e extensão da calcificação coronariana. Nesse estudo 49% dos pacientes com AR apresentavam RI.

Por outro lado, poucos estudos relataram ausência de associação entre a RI na AR e atividade de doença. Garcia Díaz et al [28] não encontraram diferenças nos valores de HOMA e índice de

verificação quantitativo de sensibilidade à insulina (QUICKI) quando comparou 74 pacientes com AR e 74 controles, não havendo também relação entre RI com atividade de doença e PCR. Mirjafari et al [29] estudaram pacientes com AR precoce (até 24 meses do início dos sintomas) e encontraram RI em 60% dos pacientes. A RI esteve associada a parâmetros tradicionais como obesidade, hipertensão, dislipidemia e à soropositividade para fator reumatoide e/ou anti-CCP. Entretanto, não encontraram associação com atividade da doença medida pelo DAS-28.

Outro estudo pesquisou a resistência à insulina por teste de tolerância endovenoso à glicose com amostras frequentes (FSIVGTT), que refletiria a sensibilidade da musculatura esquelética à insulina de forma mais acurada que os índices HOMA e QUICKI, na opinião dos autores. O estudo foi feito em 39 pacientes com AR estabelecida e 39 controles, pareados por sexo, idade, raça e índice de massa corpórea (IMC). Os autores verificaram associação de RI apenas com obesidade, não havendo associação entre RI e citocinas, atividade da doença, duração, incapacidade ou medicações utilizadas [30].

### **1.2.2 – Implicações da presença de RI na AR**

A RI é um dos principais fatores de risco para aterosclerose acelerada nos pacientes com AR [26, 31]. É preditora independente para doença cardiovascular devido à disfunção endotelial [32]. A disfunção endotelial é um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise. Ocorre uma piora no relaxamento do endotélio, devido à perda da biodisponibilidade do óxido nítrico, entre outras substâncias vasoativas. A RI causaria disfunção na ativação da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), que regula a expressão de NO em células endoteliais, prejudicando o relaxamento vascular dependente do endotélio [32]. Reciprocamente, a disfunção endotelial pode aumentar a RI, reduzindo o fluxo sanguíneo nos tecidos, causado por um desequilíbrio entre NO e a expressão de endotelina-1.

### **1.3- Estresse oxidativo**

Denomina-se estresse oxidativo a condição resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes, em favor do primeiro, causando dano tecidual. A geração e a ação de substâncias oxidantes e antioxidantes dependem de um sistema de óxido-redução, onde oxidação implica em ganho de elétrons e redução em perda. Assim têm-se utilizado o termo desequilíbrio no sistema redox para se referir ao estresse oxidativo [33]. As espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são necessárias para a ativação de vários mecanismos de defesa celular. As principais espécies reativas são peroxinitrito (ONOO-), hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), anion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ). A mitocôndria,

por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem também em macrófagos e neutrófilos, endotélio, epitélio, sistemas enzimáticos (mieloperoxidase, xantina oxidase, NADPH-oxidase, NADPH-citocromo P450 redutase, ciclo-oxigenase, óxido nítrico sintetase), reações com metal (ferro e cobre) e reação não enzimática entre os radicais superóxido e óxido nítrico resultando na formação de peroxinitrito.

O sistema de defesa antioxidante endógeno pode ser dividido em enzimático e não enzimático. O enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-PX), glutatona redutase (GSHRd) e a catalase (CAT). Os endógenos não enzimáticos incluem o ácido úrico, albumina, hemoglobina, transferrina e bilirrubina.

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas supera a capacidade antioxidante, causando lesão em biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA); a oxidação de lipídios dá-se por meio da lipoperoxidação, de proteínas por carbonilação ou nitração, carboidratos por carbonilação e DNA por oxidação de bases nitrogenadas. O radical superóxido é formado em todas as células aeróbias a partir da redução parcial do oxigênio molecular. Outros sistemas podem gerar o radical superóxido: sistema NADPH oxidase, sistema xantina oxidase e a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas. A eliminação do radical superóxido é feita pela enzima superóxido dismutase (SOD), resultando na formação de peróxido de hidrogênio [34].

Os sistemas antioxidantes responsáveis pela neutralização do peróxido de hidrogênio são a enzima catalase (CAT) e o sistema enzimático composto pelo tripeptídeo glutatona (GSH), GSH-Px e GSHRd. Esse sistema opera em ciclos, uma vez que a GSH reduz o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  em reação catalisada pela GSH-Px. Nesse processo a GSH é oxidada e, em um segundo momento, é regenerada pela GSHRd utilizando equivalentes redutores da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH). Apesar de compartilhar o mesmo substrato ( $H_2O_2$ ), ambos os sistemas enzimáticos funcionam de forma diferenciada. Enquanto a GSH-Px remove pequenas quantidades, a CAT age de forma mais significativa contra níveis elevados de  $H_2O_2$  [34].

O peróxido de hidrogênio culmina na geração do radical  $OH\cdot$ , que é a ERO mais deletéria ao organismo e contra a qual não há sistema enzimático de defesa. O radical  $OH\cdot$  é o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, agindo como catalisador de conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais alcóxila ( $LO\cdot$ ) e peróxila ( $LO_2\cdot$ ), desencadeando reações em cadeia que culminam com formação de produtos de oxidação biologicamente ativos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal [34].

O óxido nítrico (NO) é um radical livre produzido a partir da L-arginina por reação mediada pela enzima óxido nítrico sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS). É importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais.

Entretanto, é potencialmente tóxico em situações de estresse oxidativo. A detecção do NO usualmente é feita por medida indireta, por exemplo, pela dosagem plasmática ou urinária de nitrato e nitrito [35].

### 1.3.1 Estresse oxidativo e artrite reumatoide

Estudos epidemiológicos mostram uma associação inversa entre a ingestão de alimentos antioxidantes e a incidência de AR [36] e associação inversa entre os níveis de antioxidantes e inflamação [37]. Estudo piloto mostrou que o consumo de antioxidante (pomegranete) diminui o estresse oxidativo e diminui a atividade da doença na AR. [38]. O consumo de água enriquecida com hidrogênio molecular ( $H_2$ ), que seria um antioxidante do radical hidroxil, reduziu DAS28 em pacientes com AR [39].

O estresse oxidativo na AR deve-se a um aumento da produção de EROs e diminuição nas defesas antioxidantes [40–42]. O papel do estresse oxidativo tem sido demonstrado na patogênese da AR mediante aumento de peróxido de hidrogênio que inibe a síntese de proteoglicanos da cartilagem [43, 44]. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem ativar metaloproteases, danificando componentes da matriz extracelular [45]. Estudo experimental comparou camundongos *knock-out* do gene *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) (Nrf2 é um fator de transcrição que regula a expressão gênica de enzimas antioxidantes) com animais que apresentavam o gene funcional (*Nrf2-wild – type control*) e demonstrou que os primeiros apresentaram lesões mais graves na cartilagem e maior dano oxidativo. EROs e ERNs podem diretamente afetar o DNA e impedir mecanismos reparadores [46] e ativar osteoclastos [47]. O microambiente de hipóxia da sinóvia articular inflamada pode induzir fatores de transcrição que respondem a oxigenação [*Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) e fator nuclear capta B (NF- $\kappa$ B)], levando à expressão de um espectro de genes que são críticos à persistência da sinovite [45, 48, 49] (figura 2).

Os agentes anti-TNF $\alpha$  parecem diminuir ou suprimir o estresse oxidativo nos pacientes com AR, talvez somente por controlar o processo inflamatório e não por atuar diretamente sobre a produção das espécies reativas [50]. Binięcka et al. dosaram 4-hidroxi-nonanal, produto da peroxidação lipídica, no líquido sinovial antes e 3 meses após uso de anti-TNF $\alpha$  e concluíram que houve supressão do estresse oxidativo em 14 pacientes com AR e 4 pacientes com artrite psoriásica [51]. Outro estudo comparou pacientes com AR que utilizaram anti-TNF $\alpha$ , tocilizumabe (inibidor de IL-6) e DMARDs convencionais. Todos os grupos apresentaram EO maior que o valor normal, porém o grupo DMARDs foi o que apresentou maiores valores, seguido do grupo anti-TNF $\alpha$ . O grupo anti IL-6 teve a maior diminuição no EO, dramaticamente menor que DMARDs e com diferença estatística em relação ao grupo anti-TNF $\alpha$ . [52]. Etanercepte também diminuiu os marcadores do estresse oxidativo relacionados ao dano de proteínas, lipídios e DNA, havendo também correlação entre o EO e a atividade da doença medida pelo DAS28 [53].

A peroxidação lipídica provavelmente contribui para o processo de aterosclerose acelerada na AR. A inflamação local e sistêmica persistente promove a lipólise, e a liberação sistêmica de ácidos graxos contribui para a dislipidemia vista na AR. O EO produzido pela inflamação local leva a oxidação do LDL local, que promove aumento de moléculas de adesão e citocinas [45].

O estresse oxidativo correlacionou-se com a atividade da doença avaliada pelo DAS28 na maioria dos estudos [54–57].

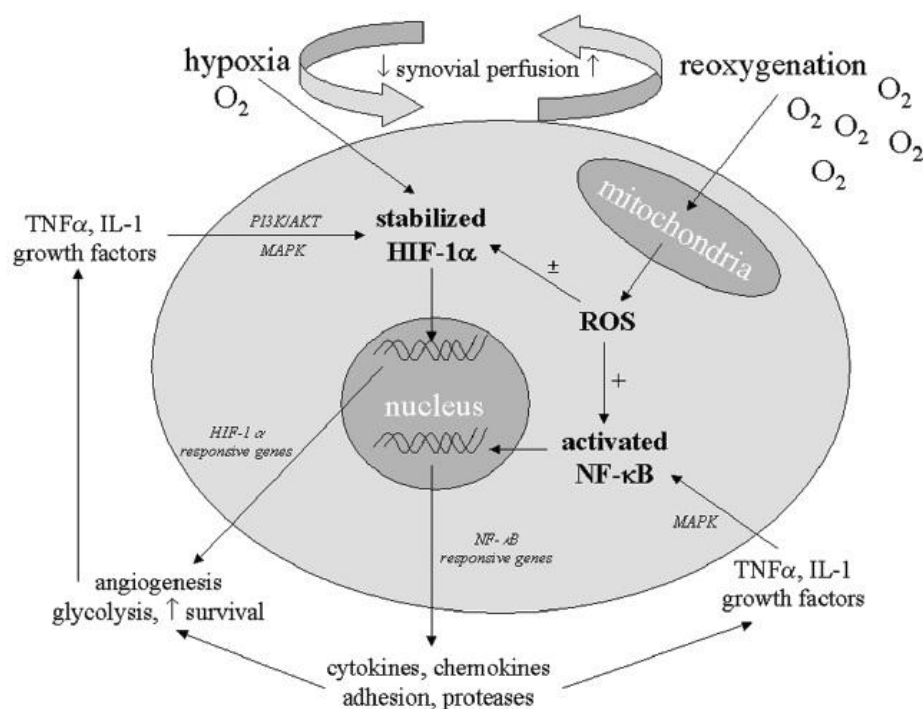


Figura 2 - Regulação das vias do HIF-1 (*hypoxia-inducible factor*) e NF-κB por espécies reativas de oxigênio e estimulação por citocinas. A complexa ativação destes dois fatores de transcrição críticos é fundamental para a maioria dos processos que sustentam a sinovite na AR, como ativação endotelial, recrutamento de leucócitos, angiogênese e aumento da sobrevivência da célula. IL interleucina; MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos; PI3K: fosfoinositídeo 3-quinase, TNFα: fator de necrose tumoral alfa

Fonte: Adaptado de Hitchon, 2004

#### 1.4 - Estresse oxidativo e RI

Há vários mecanismos que podem explicar o desencadeamento da RI devido ao estresse oxidativo.

Carbonilação e nitrosilação de proteínas em tecidos insulino-sensíveis estão associados à etiologia da RI em vários modelos animais [58].

A RI está associada ao aumento dos estoques de ferritina que, via reação de Haber-Weiss, gera hidroxil e conseqüentemente lipoperoxidação. Estudos prévios relataram aumento dos estoques de

ferro na RI [59–61]. Kim et al [62] realizou estudo com cerca de 13000 indivíduos e encontrou associação entre hiperferritinemia e RI mesmo após ajuste dos níveis de PCR-us, sugerindo portanto que a hiperferritinemia não seria simplesmente decorrente do estado inflamatório alterado que esses pacientes apresentam. Outro estudo sugere que a hiperinsulinemia pode ser responsável pelo acúmulo de ferro no fígado porque a insulina pode estimular a captação de ferro por um mecanismo de externalização do receptor de transferrina [59]. Além disso, existem evidências de que o acúmulo de ferro pode contribuir com o desenvolvimento de RI comprometendo a síntese e secreção de insulina pelo pâncreas e sua ação nos tecidos-alvo [61]; a diminuição dos estoques de ferro, após a doação de sangue ou flebotomia, esteve associada a melhora da sensibilidade à insulina [63, 64]. Portanto, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo aumento da ferritina na RI ainda são desconhecidos.

O aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial tem importante papel no desenvolvimento de RI no músculo esquelético. Experimentos em animais com RI induzida por dieta rica em gorduras e em humanos com obesidade mórbida comprovaram o excesso de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial. Além disso, houve atenuação da produção de peróxido de hidrogênio e da RI quando um antioxidante foi administrado apesar da dieta rica em gorduras [65].

Outro importante mecanismo causador da RI é a ativação da NADPH oxidase [66], devido ao aumento da angiotensina II. A angiotensina II (ANG II) liga-se a receptores de angiotensina tipo 1 (AT1R) em várias células, incluindo as do músculo esquelético e cardiomiócitos, ativando a NADH oxidase, produzindo anions superóxido e diminuindo a sinalização da insulina [67] (figura 3).

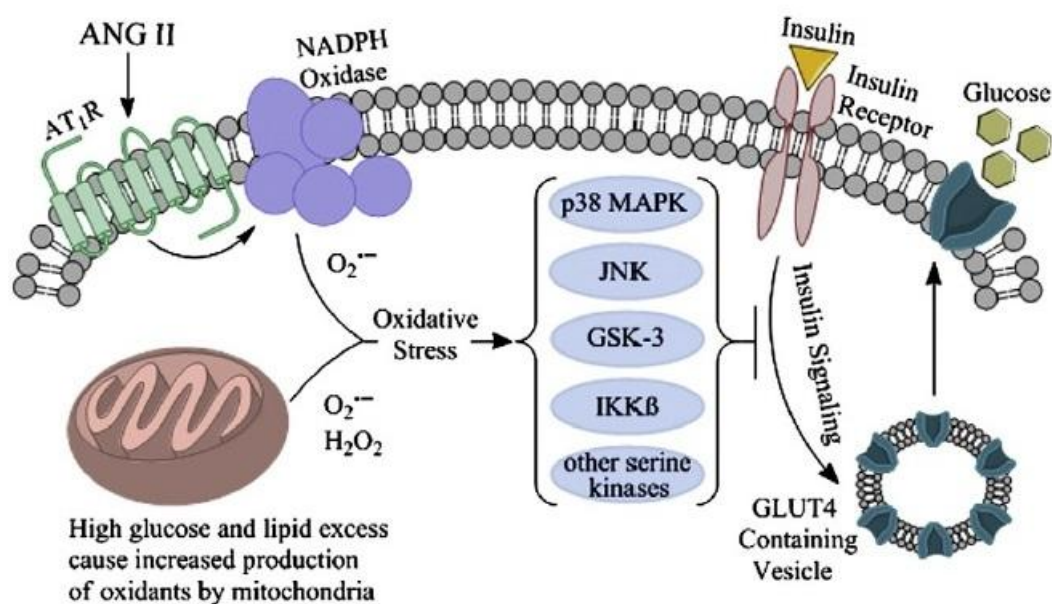


Figura 3: Representação esquemática da superprodução de oxidantes derivados da NADPH oxidase e de fontes mitocondriais em músculo esquelético de mamíferos com subsequente aumento de p38MAPK e outras quinases ativadas pelo estresse, incluindo JNK, K3 $\beta$ , IKK $\beta$  e outras, associada à diminuição da sinalização estimulada pela insulina e redução no transporte da glicose.

Fonte: Adaptado de Henriksen, 2011

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo geral

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar o envolvimento do TNF- $\alpha$  e RI no processo inflamatório, estresse oxidativo e atividade da doença em pacientes com AR.

### 2.2- Objetivos específicos

- Avaliar o estado redox em pacientes com AR na presença ou não de RI por meio de marcadores da peroxidação lipídica (hidropéroxido lipídico), oxidação proteica (produtos avançados da oxidação proteica) e defesas antioxidantes (TRAP) em pacientes com AR.
- verificar se a RI na AR está associada ao processo inflamatório, estresse oxidativo e atividade da doença.
- verificar se há associação do estresse oxidativo com os marcadores de prognóstico e atividade da doença.
- verificar o envolvimento do uso da terapia anti-TNF- $\alpha$  na RI e no estresse oxidativo.

### 3- METODOLOGIA

#### 3.1 Delineamento do estudo

Estudo observacional tipo caso-controle envolvendo pacientes com AR acompanhados no ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) de Londrina.

#### 3.2 População

Foram selecionados consecutivamente pacientes com diagnóstico de AR atendidos no ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) de Londrina entre março de 2013 e junho de 2014.

Dos 188 pacientes com AR que aceitaram o convite 15 foram excluídos por apresentarem outras doenças autoimunes sobrepostas à AR. As consultas foram realizadas por dois reumatologistas na mesma data da coleta de sangue.

O grupo controle foi composto por 97 indivíduos saudáveis doadores de sangue, atendidos pelo Hemocentro Regional de Londrina.

Os grupos foram pareados pelo sexo, idade e etnia.

Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido antes da realização de qualquer procedimento (anexo A). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob parecer nº205.175 (anexo B).

##### 3.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos os pacientes portadores de AR que preencheram os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) e da *European League Against Rheumatism* (EULAR) 2010, maiores de 18 anos e menores que 70 anos. No grupo controle o critério de inclusão foi idade maior de 18 anos e menor que 70 anos.

##### 3.2.2 Critérios de exclusão

No grupo controle, os critérios de exclusão foram a presença de doença autoimune, cardíaca, renal ou hepática, uso de medicamentos anti-inflamatórios ou de suplemento nutricional com atividade antioxidante. No grupo de pacientes foram excluídos aqueles com outras comorbidades associadas, como por exemplo, diabetes, doenças infecciosas crônicas ou agudas, outras doenças autoimunes, doença hepática ou renal, uso de metformina e estatinas.

Informações referentes ao estilo de vida, duração da AR, tabagismo (sim ou não), manifestações extra-articulares, uso de anti-inflamatórios não esteroidais, corticosteróides, drogas modificadoras de doença (DMARDs), agentes biológicos (medicamentos) e antihipertensivos foram obtidas durante a consulta clínica destes pacientes.

### **3.3. Determinações Antropométricas**

O peso corporal foi aferido utilizando balança eletrônica com escala de 0,1kg. Os indivíduos vestiam roupas leves, sem sapatos, pela manhã. A altura foi aferida por meio de estadiômetro com escala de 0,1 cm. Índice de massa corpórea (IMC) foi calculado segundo a fórmula: peso (kg) dividido pela altura (m) elevada ao quadrado.

### **3.4. Análises Bioquímicas e Imunológicas**

As amostras de sangue foram coletadas após 12 horas de jejum. As análises de ácido úrico e glicose foram efetuadas em um auto-analisador bioquímico (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA), utilizando-se kits Dade Behring<sup>®</sup>. A determinação de insulina foi realizada por quimiluminescência (QL) em micropartículas (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). A velocidade de hemossedimentação (VHS) foi medida por automação – VES-MATIC CUBE 30, (DIESSE, Italy). Os níveis séricos de PCR de alta sensibilidade (PCR-us) foi medida por nefelometria (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany) e o FR foi pesquisado por método automatizado de nefelometria (sistema BN II/BN ProSpec), utilizando kit comercial da marca Siemens kit FR látex N. Anticorpo anti-CCP foi pesquisado pelo imunoensaio quimioluminescente por micropartículas para a determinação semi-quantitativa da classe IgG de auto-anticorpos específicos para o peptídeo citrulinado cíclico (CCP) em amostras de soro e plasma humanos, utilizando o Sistema ARCHITECT. Os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  foram medidos por enzaimunoensaio (ELISA) utilizando kit comercial (Ready-Set Go! Set, e-Bioscience, San Diego, California, USA). Foi calculado o Índice de RI (HOMA - Homeostasis Model Assessment) de acordo com a fórmula :  $HOMA-IR = \text{insulina jejum (uU/mL)} \times \text{glicose jejum (nmol/L)} / 22,5$  [68].

### **3.5. Avaliação do estresse oxidativo**

#### **3.5.1 Capacidade Antioxidante Total Plasmática**

A capacidade antioxidante total plasmática foi avaliada pela medida do *total radical-trapping antioxidant parameter* (TRAP) por QL, em uma adaptação da técnica descrita por Repetto et al [69]. Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma. Ao meio de reação (1,8 mL de tampão glicina 0,1 M, pH 8,6) são acrescentados 100  $\mu$ L de luminol em solução aquosa 200

$\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{L}$  de soro diluído 50% em tampão glicina e 100  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de 2,2' azo-bis (2-amidinopropano) 200 mM. É bem sabido que o 2,2' azo-bis gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular, causando a oxidação de lipídeos e proteínas em biomoléculas [70]. Estes radicais livres reagem com o luminol (que atua como um amplificador de sinal), produzindo QL. Esta reação é inibida pela superóxido dismutase (SOD), catalase e análogos da vitamina E. A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (tempo de indução  $t_i$ ) proporcional à concentração plasmática de antioxidantes (TRAP) até que os radicais do luminol sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema foi calibrado com análogo de vitamina E (Trolox), 100 $\mu\text{L}$  na concentração de 20  $\mu\text{M}$  em tampão glicina pH 8,6. Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma, permitirão obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox segundo a equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = D \times \frac{\text{tamostra}}{t\text{Trolox}}$$

D é um fator de diluição da amostra no meio de reação, tamostra é o tempo de indução promovido pela adição da amostra de plasma, tTrolox é o tempo de indução promovido por 1  $\mu\text{M}$  de Trolox. Os resultados serão expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox. Este experimento será conduzido em um contador  $\beta$  marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, utilizando-se um modo de contagem não coincidente por 30 minutos, com uma faixa de resposta entre 300 a 620 nM.

A concentração de ácido úrico (AU) é responsável por 60% da capacidade antioxidante plasmática total. Assim, as concentrações de TRAP foram corrigidas e expressas em  $\mu\text{M}$  Trolox por miligrama de ácido úrico ( $\mu\text{M}$  Trolox /mg AU) [71, 72].

### 3.5.2 Determinações de Produtos Avançados da Oxidação Protéica (AOPP)

AOPP foi determinada de acordo com o método de Witko-Sarsat et al [73]. Os valores foram expressos em  $\mu\text{moles/L}$  de equivalente de cloramina. A técnica é baseada na formação de produtos de oxidação de proteínas por ação de agentes oxidantes e posterior reação destes produtos de oxidação com o iodeto de potássio em meio ácido. Os AOPP foram quantificados no plasma. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro termostaticado de duplo feixe (Thermo Spectronic ® modelo Hélios- $\alpha$ , Waltham, MA, EUA).

### 3.5.3 QL induzida por t-Butil Hidroperóxidos

A avaliação da formação de lipoperóxidos por QL será efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha e colaboradores [74]. A QL estimulada por t-butil hidroperóxido foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não-enzimáticos e os níveis de

lipoperóxidos. Este teste baseia-se na premissa de que um aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E e formação de lipoperóxidos, resultando em aumento da emissão de fótons .

As análises foram realizadas em frascos plásticos para cintilação com capacidade para 20 mL e protegidos da luz. O meio de reação consiste de 1750  $\mu$ L de tampão fosfato 30 mM pH 7,4 e KCl 20 mM (v/v) acrescidos de 250  $\mu$ L de soro e mais 20  $\mu$ L de terc-butil (t-BuOOH) com concentração final de 3 mM em 2,0 mL de meio de reação. A QL será medida em um contador  $\beta$ marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, em um modo de contagem não coincidente, com uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm. Este experimento foi conduzido a uma temperatura de 30°C. Os resultados foram expressos em contagem por minuto (c.p.m.).

### **3.5.5 – Índice pró-oxidante / antioxidante (PAI)**

O desequilíbrio do estresse oxidativo foi verificado pelo índice AOPP/TRAP, que indica a razão oxidante/antioxidante como reflexo do estado redox celular .

AOPP tem sido apontado como o parâmetro mais apropriado para a determinação do estresse oxidativo nos pacientes com síndrome metabólica [75, 76]. AOPPs são formados durante o estresse oxidativo pela ação de oxidantes cloraminados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas, produzidas por mieloperoxidases em neutrófilos ativados [76, 77]. Sugere-se que seja um marcador precoce de diabetes mellitus [78] e síndrome metabólica [76] .

A razão entre pró-oxidantes e antioxidantes têm sido utilizada como um marcador do estresse oxidativo em diversos trabalhos, por metodologias diferentes. Verificamos em outros estudos realizados por este grupo de pesquisa [72, 79] a boa correlação que este índice tem fornecido na avaliação do estresse oxidativo na síndrome metabólica.

### **3.6. Análise Estatística**

Comparações entre os controles e pacientes foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn e os dados foram expressos como medianas e interquartis (25%-75%). A distribuição de sexo, etnia e terapia foi analisada pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates. Os resultados foram considerados com significativos quando  $p < 0.05$ . Foi utilizado o programa de análise estatística Graph Pad Prism version 4.0. Para determinar quais fatores foram independentemente associados com RI, as variáveis que apresentaram  $p < 0.10$  na análise univariada foram incluídas no modelo de regressão logística multivariada. As análises multivariadas foram feitas pelo GraphPad Instat versão 3.0 (GraphPad Software, SanDiego, CA).

**4 ARTIGO**

**Role of Tumor Necrosis Factor-alpha on the Inflammatory Process, Oxidative Stress and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis and Insulin Resistance**

## **Role of Tumor Necrosis Factor-alpha on the Inflammatory Process, Oxidative Stress and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis and Insulin Resistance**

Neide Tomimura Costa<sup>1</sup>, Tatiana Mayumi Veiga Iryioda<sup>1</sup>, Ana Paula Kallaur<sup>2</sup>, Francieli Delongui<sup>3</sup>, Daniela Alfieri Frizon<sup>3</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>3</sup>, Ricardo Braga Amin<sup>1</sup>, Vinicius Daher Alvares Delfino<sup>4</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>3</sup>, Isaias Dichí<sup>4</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>3</sup>

1. Department of Rheumatology, University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;
2. Department of Clinical Analysis, University North of Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brazil;
3. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;
4. Department of Internal Medicine - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

Corresponding author: Andrea Name Colado Simão, PhD. Department of Clinical Pathology. Robert Koch Avenue nº 60 Bairro Cervejaria, University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440 Tel: (55) 43 3371 2321 E-mail: [deianame@yahoo.com.br](mailto:deianame@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

**Introduction:** Systemic chronic inflammation and oxidative stress have been proposed as major protagonists in the pathogenesis of insulin resistance (IR) in patients with rheumatoid arthritis (RA). TNF-alpha plays a central role in the pathogenesis of RA and has also been implicated in the development of IR and oxidative stress increase. **Objective:** To evaluate the involvement of TNF-alpha and insulin resistance on the inflammatory process, oxidative stress and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Methods:** This case-control study included 270 subjects (control group, n= 97) and RA patients (n = 173). RA patients were divided into two groups: without insulin resistance (IR-) and with IR (IR+). After that, RA patients were divided into four groups: the first group without IR and not using anti-tumor necrosis factor (TNF) alpha (G1, IR- TNF-); the second group without IR and using anti-TNF alpha (G2, IR- TNF+); the third group with IR and not using anti-TNF alpha (G3, IR+ TNF-) and the fourth group with IR and using anti-TNF alpha (G4, IR+ TNF+). Anthropometric, biochemical, immunological and oxidative stress parameters were measured. **Results:** IR+ group had an increased disease activity score 28 (p=0.043) with enhanced frequency in patients with high disease activity, higher erythrocyte sedimentation rate (p=0.023), CRP (p=0.040), plasma TNF alpha levels (p< 0.05), advanced oxidation protein products (AOPPs) (p<0.0001), pro-oxidant/antioxidant index (PAI) (p<0.001) and lower total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) (p< 0.05) in relation to the IR- group. G3 and G4 had higher (p< 0.05) AOPPs and PAI compared to G1. G4 group presented higher (p< 0.05) AOPPs and PAI than G2. TRAP was significantly lower in G3 compared to G1. Plasma TNF alpha levels were significantly higher in G4 and G2 compared to G1 (p< 0.0001) and G3 (p< 0.0001 and p< 0.01, respectively). **Conclusion:** The concomitant presence of TNF alpha and IR are important factors involved in redox imbalance in patients with RA and it seems to be due to the maintenance of inflammatory state and disease activity. An understanding of the complex interactions of oxidative stress, TNF alpha and IR might allow the development of novel therapeutic targets for RA.

Key-words: rheumatoid arthritis, insulin resistance, oxidative stress, anti-TNF $\alpha$  therapy, disease activity score

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that leads to severe joint destruction. In addition, RA patients have higher risk of developing cardiovascular disease (CV) and this is related to chronic inflammation [1] and corticosteroids (CT) treatment [2, 3]. Systemic chronic inflammation and proinflammatory cytokines have been proposed as major protagonists in the pathogenesis of insulin resistance (IR), an important factor for CV [4, 5]. TNF- $\alpha$  plays a central role in the pathogenesis of RA [6, 7] and has also been implicated in the development of IR [4, 8]. In addition, abnormalities in glucose metabolism have been well documented in RA patients and may also correlate with Disease Activity Score evaluating 28 joints (DAS 28) [9].

Oxidative stress has a prominent role in the etiology, pathogenesis of joint tissue injury and chronic inflammation in patients with RA, which may lead to connective tissue degradation and joint and periarticular deformities [10]. Reactive oxygen species (ROS) have been considered an enhancer factor for autoimmune disease risk [11]. ROS are important intracellular signaling molecules in the cells of the immune system that amplify the synovial inflammatory-proliferative response [12]. Previous studies showed that elevated levels of lipoperoxidation and decreased antioxidant system in RA are positively correlated with DAS 28 and C-reactive protein (CRP) [13, 14]. Moreover, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) can induce higher oxidative stress by initiators of the NF-kB activation cascade and are under its transcriptional control, constituting a positive feedback loop [11].

Our group has investigated the development of IR and the metabolic syndrome in chronic inflammatory diseases [15–18] and these reports have found an important role of oxidative stress in the development and maintenance of these conditions. Therefore, it seems that chronic inflammation and oxidative stress contribute to the pathogenesis of both RA and IR. Furthermore, previous studies have shown that IR [8, 19–21] and oxidative stress [22–26], independently, may impair disease activity in patients with RA. Therefore, the primary aim of the present study was to evaluate the involvement of TNF- $\alpha$  on the inflammatory process, oxidative stress and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. A second objective was to study the influence of IR on the same parameters.

## PATIENTS AND METHODS

### Subjects

This case-control study included 270 subjects, healthy individuals (control group, n= 97) and RA patients (n = 173), aged between 18 and 70 years. The control group was selected among blood

donors of the University Hospital and RA patients were selected from among the ambulatory of Rheumatology of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. RA patients were initially divided into two groups: the first group without IR (IR-, n=91) and the second group with IR (IR+, n=82). After that, RA patients were divided into four groups: the first group without IR and not using anti-TNF- $\alpha$  (G1, IR- TNF-, n=71); the second group without IR and using anti-TNF- $\alpha$  (G2, IR- TNF+, n=20); the third group with IR and not using anti-TNF- $\alpha$  (G3, IR+ TNF-, n=63) and the fourth group with IR and using anti-TNF- $\alpha$  (G4, IR+ TNF+, n=19). RA patients (G2 and G4) were using anti-TNF- $\alpha$  at least for six months. Sex, age, and ethnicity were controlled. RA was classified according the 2010 rheumatoid arthritis classification criteria [27].

Disease activity status was determined using DAS28 [9], erythrocyte sedimentation rate (ESR) and visual analog score. Patients were classified according to their disease activity into four different groups, namely, (1) remission group:  $DAS \leq 2.6$ ; (2) low disease activity group:  $2.6 < DAS \leq 3.2$ ; (3) moderate disease activity group  $3.2 < DAS \leq 5.1$  and (4) high disease activity group:  $DAS > 5.1$ .

None of the subjects was receiving a specific diet. The individuals of both groups (control and RA) did not drink alcohol regularly. None of the participants in the study presented heart, thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal or oncological diseases, and none were receiving estrogen replacement therapy, drugs for hyperlipidemia, hyperglycemia or antioxidant supplements. This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and the Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil approved all procedures involving human subjects and patients. Written informed consent was obtained from all subjects/patients.

### **Anthropometric and Blood Pressure Measurements**

Body weight was measured to the nearest 0,1 kg by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes, in the morning.; height was measured to the nearest 0,1 cm by using a stadiometer. Body mass index was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Waist circumference (WC) was measured on standing subjects midway between the lowest rib and the iliac crest.

### **Biochemical, Immunological, and Hematological Biomarkers**

After fasting for 12 hours, the patients underwent the following laboratory blood analysis: glucose and uric acid (UA) were evaluated by a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA), using Dade Behring® kits; plasma insulin level and anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP) were determined by chemiluminescence microparticle immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The homeostasis model assessment IR (HOMA-IR) was used as a surrogate measurement of insulin sensitivity [28]. HOMA-

IR = insulin fasting ( $\mu\text{U/ml}$ ) X glucose fasting ( $\text{nmol/L}$ ) / 22.5. IR was considered when HOMA-IR  $\geq$  2.114 [8].

hsCRP (highly sensitive CRP) and rheumatoid factor (RF) were measured using a nephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany). TNF- $\alpha$  levels were measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial immunoassay ELISA (Ready-Set Go! Set, e-Bioscience, San Diego, California, USA). Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was obtained by automated kinetic-photometric method (Ves-Matic CUBE 30, DIESSE, Siena, Italy).

### **Oxidative Stress Measurements**

Samples for evaluating oxidative stress and total antioxidant capacity were performed with EDTA as anticoagulant and antioxidant. All samples were centrifuged at 3.000 rpm for 15 minutes and plasma aliquots stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until assayed.

### **Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH)**

CL-LOOH in plasma was evaluated as described previously by Gonzales-Flecha et al [29]. The results were expressed in relative luminescence units (RLU).

### **Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)**

AOPP was determined in the plasma using the semiautomated method described by Witko-Sarsat et al [30]. AOPP concentrations were expressed as micromoles per liter ( $\mu\text{mol/L}$ ) of chloramines-T equivalents.

### **Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)**

TRAP was determined as reported by Reppeto et al [31]. This method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog TROLOX, and the values of TRAP are expressed in equivalent of  $\mu\text{M}$  Trolox/mg UA.

### **Pro-oxidant / Antioxidant Balance (PAI)**

Oxidative stress imbalance was verified when PAI was calculated as AOPPs ( $\mu\text{mol/L}$ ) divided by TRAP ( $\mu\text{M}$  Trolox/mg UA), which indicates the oxidant-antioxidant ratio as a reflection of the cellular redox state.

### Statistical analysis

Distribution of sex, ethnicity, and therapy was analyzed by chi-square test with Yates correction. Comparisons between groups were performed using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post test and data were expressed as the median (25%-75%). The results were considered significant when  $p < 0.05$ . A statistical analysis program (Graph Pad Prism version 4.0) was used for evaluations. To determine which factors were independently associated with IR, the variables that presented  $p < 0.10$  in univariate analyses were included in multivariate logistic regression model. Multivariable analyses were evaluated by the GraphPad Instat version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

### RESULTS

Rheumatoid arthritis patients with or without IR were not statistically different in relation to disease duration, serum RF and anti-CCP levels, frequency in prednisone, antimalarials, anti-TNF $\alpha$ , metotrexate and leflunomide use (table 1). However, IR+ group had an increased DAS 28 ( $p=0.043$ ) with enhanced frequency in patients with high disease activity. In addition, IR+ group showed higher ESR ( $p=0.023$ ) and CRP ( $p=0.040$ ) compared to the IR- group (table 1). Extra-articular features were not different in the groups (data not shown).

With regard to anthropometric and biochemical markers, IR+ group presented higher BMI ( $p < 0.0001$ ), WC ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.0001$ ), plasma glucose ( $p < 0.0001$ ), insulin ( $p < 0.0001$ ) levels and HOMA-IR ( $p < 0.0001$ ) compared to the control group and IR- group, respectively (table 2).

In relation to oxidative stress markers, both IR- and IR+ groups had significant higher PAI ( $p < 0.0001$ ) compared to the control group, whereas IR- group showed lower AOPPs ( $p < 0.05$ ) levels compared to the control group. Higher AOPPs ( $p < 0.0001$ ) and PAI ( $p < 0.001$ ) and lower TRAP ( $p < 0.05$ ) was verified in the group composed by patients IR+ in relation to the IR- group. Meanwhile, hydroxyperoxides showed no statistical difference between the groups (table 3). Plasma TNF- $\alpha$  levels were significantly higher both in IR- ( $p < 0.01$ ) and IR+ ( $p < 0.0001$ ) groups compared to the control group (figure 1). Multivariable analyses showed that PAI was independently associated with IR ( $p < 0.05$ ) (data not shown). In addition, IR+ had higher plasma TNF- $\alpha$  levels than IR- group ( $p < 0.05$ ) (figure 1).

Table 4 shows the differences when the groups were divided taking into account the presence or absence of IR and anti-TNF- $\alpha$  use. The groups composed by patients with IR, IR+ TNF- (G3) and IR+ TNF+ (G4) had higher ( $p < 0.05$ ) AOPPs and PAI compared to the control group (G1). Also, G4 group presented higher ( $p < 0.05$ ) AOPPs and PAI than IR- TNF+ (G2). TRAP was significantly lower in IR+ TNF- group (G3) in relation to G1. On the other hand, the groups without insulin resistance G1 and G2 showed no differences in oxidative stress markers (table 4). In relation to the inflammatory

profile, ESR showed significantly higher ( $p < 0.05$ ) levels in G3 and G4 than in G1, and G4 had also increased ESR ( $p < 0.05$ ) levels compared to G2. There were significantly lower ( $p < 0.05$ ) CRP levels in G4 compared to G3 (table 4). Plasma TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in patients who were using anti-TNF- $\alpha$ , that is, G4 ( $p < 0.0001$ ) and G2 ( $p < 0.0001$ ) compared to G1 (figure 2). Also, G4 and G2 had higher plasma TNF- $\alpha$  levels than G3 ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.01$ , respectively) (figure 2).

## DISCUSSION

The main findings of the present study were that the presence of IR was related to increase in DAS 28 score, ESR, CRP, TNF- $\alpha$  levels, AOPPs, PAI and decreased TRAP in patients with RA. In addition, the current study seems to confirm the importance of TNF- $\alpha$  increase as one of the main mechanisms involved in IR development in patients with RA. On the other hand, IR did not participate in changes related to RF and anti-CCP.

Several reports have shown that IR is related to chronic inflammation [1, 32, 33] and CT treatment [2, 3]. Although previous articles have shown that corticosteroid may be involved in IR [19, 20, 34], this finding has not been verified in patients with RA, suggesting that corticosteroid beneficial anti-inflammatory effects would compensate the deleterious metabolic action [35, 36]. Penesova et al [36] showed that low-dose glucocorticoid treatment with duration of 2-9 years is relatively safe and did not lead to glucose metabolism impairment. Independently if they had IR or not, in the present study the patients did not differ in the frequency they were using prednisone, showing that in this cohort of RA patients, corticosteroid use do not seem a determinant factor for IR development. Moreover, patients used less than 7,5 mg/d corticosteroid (data not shown), which has been reported as safe [37].

Several reports have shown the association between chronic inflammatory disease states and IR [32, 33, 38]. Previous studies demonstrated that TNF- $\alpha$  may have an important role in the IR pathogenesis by multiple mechanisms, such as downregulation of genes that are required for normal insulin action, direct effects on insulin signaling, induction of elevated free fatty acids via stimulation of lipolysis, and negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), an important insulin-sensitizing nuclear receptor [39]. *In vitro* studies have shown that TNF- $\alpha$  induced serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and inhibited insulin receptor tyrosine kinase, causing a change of the insulin signaling [40]. In the present study, patients using anti-TNF- $\alpha$  therapy showed higher TNF- $\alpha$  levels, which is generally indicated to patients who have a severe disease not controlled by disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs). Even with anti-TNF- $\alpha$  therapy, TNF- $\alpha$  levels have not reached the values obtained by patients who control disease activity

with conventional therapy, as well as DAS 28 maintained higher score ( $\geq 3.3$ ) than the recommended for patients using or not biological agents [41]. Of note, the majority of our patients (66.7%), who were taking anti-TNF- $\alpha$  therapy, used etanercept, a soluble TNF- $\alpha$  receptor fusion protein. Etanercept prolongs the half-life of TNF- $\alpha$  with a subsequent rise in measured serum TNF- $\alpha$  levels, thus it renders TNF- $\alpha$  biologically inactive and unavailable to bind to its receptor [42–44]. In the current study, patients with IR had also higher ESR concomitantly to TNF- $\alpha$  increase, demonstrating that chronic inflammatory process may be associated to IR development and maintenance in patients with RA. Regarding the present data, it is not possible to assure that etanercept changed TNF- $\alpha$  in a biologically inactive substance. However, it is conceivable to suggest that other proinflammatory cytokines, which were not evaluated in this study, may be involved in the inflammatory process verified in patients with IR.

The present study demonstrated that RA patients with IR have higher TNF- $\alpha$  levels and unfavorable oxidative status. Reactive oxygen species (ROS) damage both cellular elements in cartilage directly and components of the extracellular matrix either directly or indirectly by upregulating mediators of matrix degradation. ROS impair chondrocyte response to growth factors and migration to sites of cartilage injury. In addition, ROS inhibit the synthesis of matrix components including proteoglycans by chondrocytes [12]. In the present study, IR patients showed higher oxidative stress levels and DAS 28 score. The overproduction of TNF- $\alpha$  is thought to be the main contributor to increased ROS release in RA patients [22, 45, 46], leading to tissue damage and IR [47, 48]. Large amounts of ROS have been detected in the synovial fluid in RA [49], and this production can be induced by TNF- $\alpha$  stimulation [50]. TNF $\alpha$  exerts its cytotoxic effects via generation of intracellular ROS that induce apoptosis [51, 52]. Moreover, TNF- $\alpha$  can induce ROS production from neutrophils through pathway activating phagocytic NADPH oxidases in mitochondria [53], and TNF- $\alpha$  combined with cytokines such as GM-CSF or G-CSF enhances  $O_2^-$  generation [54]. Of note, oxidative stress and IR are closely associated and many evidences have shown that oxidative stress can lead to IR by promoting the expression of several proinflammatory cytokines, mainly TNF- $\alpha$ , interleukin 6 (IL-6) and interleukin 17 (IL-17), which can cause significant decline in insulin sensitivity [9]. On the other hand, ROS may increase TNF- $\alpha$  levels because they function as a second messenger to stimulate nuclear factor Kappa B-dependent expression of proinflammatory cytokines [55]. All together, our data allow suggesting that higher TNF- $\alpha$  level can be involved in IR development and maintenance and have a direct influence on oxidative stress. It seems to have a cyclic and complex relationship between TNF- $\alpha$ , oxidative stress and IR in patients with RA.

The administration of biological drugs seems to have a role in increasing the mechanism of the barrier which the body possesses against oxidative stress [56]. However, data about anti-TNF- $\alpha$  therapy remain a matter of controversy. Kageyama et al [24] showed a decrease in oxidative stress

markers after six months in 22 patients with RA using etanercept. In contrast, Den Broeder et al [46] did not find any significant changes in oxidative stress markers after two weeks in 21 patients with RA taking adalimumab, although marked reduction in neutrophil influx to synovial tissue with anti-TNF- $\alpha$  therapy was reported. Meantime, Binięcka et al [45] evaluated oxidative stress, assessed by 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) in the synovial tissue, after three months in 18 patients with RA using anti-TNF- $\alpha$  therapy. DAS score  $< 2.6$  were found in seven patients who were considered as anti-TNF- $\alpha$  responders and DAS score  $\geq 2.6$  in 11 patients who were considered as anti-TNF- $\alpha$  non-responders. There was a decrease in 4-HNE levels only in anti-TNF- $\alpha$  responders patients. The aforementioned study seems to suggest that anti-TNF- $\alpha$  therapy can decrease oxidative stress in RA patients by controlling the inflammatory process, hence they do not act directly on the production of ROS. In the present study, most patients who used anti-TNF- $\alpha$  therapy were taking etanercept. Nevertheless, differently from Kageyama's et al. study [24], the patients did not show improvement in redox state. It is conceivable to suggest that this may have occurred because anti-TNF- $\alpha$  therapy maintained DAS 28 score in similar values obtained by patients who were not using anti-TNF- $\alpha$  therapy. Meantime, inflammatory process shown by increased ESR and TNF- $\alpha$  levels, mainly in RA patients with IR, progressed in these patients being responsible for oxidative stress increase.

This study corroborates with Binięcka's et al [45], which suggested that inflammatory state maintenance can be the responsible for oxidative stress found in patients with RA. On the other hand, the data of the present study show that IR is involved in an unbalanced redox state, which possible contributes to maintain a vicious circle of high-grade inflammation.

## CONCLUSIONS

This is the first study to demonstrate that the concomitant presence of IR and TNF- $\alpha$  are important factors involved in redox imbalance in patients with RA and it seems to be due to the maintenance of inflammatory state and disease activity. Although this is a transversal study, which does not allow causality, it is conceivable to hypothesize that oxidative stress may be the link between IR and increased disease activity. The data from the present study suggest a complex interaction of TNF- $\alpha$ , oxidative stress and IR. The differences in oxidative stress markers in RA patients with or without IR could contribute to a better design for future drugs and/or nutritional interventional studies in this population. In addition, more studies are warranted to verify if IR can be involved in therapeutic failure with TNF- $\alpha$  inhibitors. An understanding of the complex interactions of ROS, TNF- $\alpha$  and IR might allow the development of novel therapeutic targets for RA.

### List of abbreviations

Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide antibody; AOPP: Advanced Oxidation Protein Products, CL-LOOH: Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, CRP: C-reactive protein, CT: corticosteroid, DAS 28: Disease Activity Score evaluating 28 joints; hsCRP: highly sensitive CRP; 4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; CV: cardiovascular disease; DMARDs: disease-modifying antirheumatic drugs; ESR: erythrocyte sedimentation rate; HOMA-IR: homeostasis model assessment – insulin resistance; IL-6: interleukin 6; IL-17: interleukin 17; IR: insulin resistance; RA: rheumatoid arthritis; RLU: relative luminescence units; RF: rheumatoid factor; ROS: Disease Activity Score evaluating 28 joints; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; PAI: Pro-oxidant / Antioxidant Balance; PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ; UA: Uric acid; WC: Waist circumference

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions:** TC: helped to analyse the data and to draft the manuscript, EMVR: data analysis and manuscript drafting, critically revised the manuscript for important intellectual content. MVI and RBA: participated in clinical assessments. EMVR and VDAD: helped to analyse the data and critically revised the manuscript for important intellectual content. FD, APK, MABL, and DFA: helped to laboratory analyses. ID and ANCS: helped to design the study, to draft the manuscript, and critically revised the manuscript for important intellectual content. All authors have given final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

### Acknowledgments

This research was supported by the National Council of Brazilian Research (CNPq) and Araucaria Foundation from Paraná, Brazil.

### REFERENCES

1. Del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante a: **High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**:2737–45.

2. Gabriel SE: **Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis.** *Am J Med* 2008, **121**(10 Suppl 1):S9–14.
3. Haque S, Mirjafari H, Bruce IN: **Atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.** *Curr Opin Lipidol* 2008, **19**:338–43.
4. Luca C De, Olefsky JM: **Inflammation and Insulin Resistance.** *FEBS Lett* 2009, **582**:97–105.
5. El-Barbary AM, Kassem EM, El-Sergany MAS, Essa SA-M, Eltomey MA: **Association of anti-modified citrullinated vimentin with subclinical atherosclerosis in early rheumatoid arthritis compared with anti-cyclic citrullinated peptide.** *J Rheumatol* 2011, **38**:828–34.
6. Saxne T, Palladino MA, Heinegård D, Talal N, Wollheim FA: **Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**:1041–5.
7. McInnes IB, Schett G: **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med* 2011, **365**:2205–19.
8. Chung CP, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Avalos I, Sokka T, Raggi P, Pincus T, Stein CM: **Inflammation-associated insulin resistance: differential effects in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus define potential mechanisms.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:2105–12.
9. Prevoo MLL, van't Hof MA KH: **Modified Disease Activity Scores That include twenty-eight-joint counts.** *Arthritis Rheum* 1995:44–48.
10. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G: **Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis.** *Int J Rheum Dis* 2009, **12**:29–33.
11. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM: **Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Immunol* 2008, **152**:415–22.
12. Hitchon CA, El-Gabalawy HS: **Oxidation in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2004, **6**:265–278.
13. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E: **Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatol Int* 2002, **21**:200–4.
14. Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS: **Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity.** *Int J Rheum Dis* 2011, **14**:325–31.
15. Lozovoy M a B, Simão AC, Hohmann MSN, Simão TNC, Barbosa DS, Morimoto HK, Reiche EM V, Cecchini R, Dichi I: **Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome.** *Lupus* 2011, **20**:1356–64.
16. Lozovoy MAB, Simão ANC, Oliveira SR, Iryioda TM V, Panis C, Cecchini R, Dichi I: **Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus.** *Scand J Rheumatol* 2013, **42**:303–10.

17. Oliveira SR, Simão ANC, Kallaur AP, de Almeida ERD, Morimoto HK, Lopes J, Dichi I, Kaimen-Maciel DR, Reiche EMV: **Disability in patients with multiple sclerosis: influence of insulin resistance, adiposity, and oxidative stress.** *Nutrition* 2014, **30**:268–73.
18. Morimoto HK, Simão ANC, Almeida ERD de, Ueda LT, Oliveira SR, de Oliveira NB, Petenucci DL, Panis C, Cecchini R, Dichi I, Reiche EM V: **Role of metabolic syndrome and antiretroviral therapy in adiponectin levels and oxidative stress in HIV-1 infected patients.** *Nutrition* , **30**:1324–30.
19. Desein PH, Joffe BI: **Insulin resistance and impaired beta cell function in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:2765–75.
20. La Montagna G, Cacciapuoti F, Buono R, Manzella D, Mennillo GA, Arciello A, Valentini G, Paolisso G: **Insulin resistance is an independent risk factor for atherosclerosis in rheumatoid arthritis.** *Diab Vasc Dis Res* 2007, **4**:130–5.
21. Arcaro G: **Insulin Causes Endothelial Dysfunction in Humans: Sites and Mechanisms.** *Circulation* 2002, **105**:576–582.
22. Kageyama Y, Takahashi M: **Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF-alpha antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Rheumatol* 2008, **26**:73–80.
23. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N: **Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Biochem* 2007, **40**:167–71.
24. Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A: **Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatol Int* 2008, **28**:245–51.
25. Shahmohamdnejad S, Vaisi-Raygani A, Shakiba Y, Kiani A, Rahimi Z, Pourmotabbed T: **Association between butyrylcholinesterase activity and phenotypes, paraoxonase192 rs662 gene polymorphism and their enzymatic activity with severity of rheumatoid arthritis: Correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress, preliminary.** *Clin Biochem* 2014.
26. Nakajima A, Aoki Y, Shibata Y, Sonobe M, Terajima F, Takahashi H, Saito M, Taniguchi S, Yamada M, Nakagawa K: **Identification of clinical parameters associated with serum oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis.** *Mod Rheumatol* 2014.
27. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard H a, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, et al.: **2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:1580–8.
28. Haffner S, Miettinem H, Stern M: **The Homeostasis Model in San Antonio Heart Study.** *Diabetes Care* 1997, **20**:1087–92.
29. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A: **Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle.** *Free Radic Biol Med* 1991, **10**:93–100.

30. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B: **Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure.** *J Immunol* 1998, **161**:2524–32.
31. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S: **Oxidative stress in blood of HIV infected patients.** *Clin Chim Acta* 1996, **255**:107–17.
32. Hotamisligil GS: **Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000, **24 Suppl 4**:S23–7.
33. Popa C, Netea MG, van Riel PLCM, van der Meer JWM, Stalenhoef AFH: **The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk.** *J Lipid Res* 2007, **48**:751–62.
34. Dessein PH, Joffe BI, Stanwix AE, Christian BF, Veller M: **Glucocorticoids and insulin sensitivity in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2004, **31**:867–74.
35. Svenson KL, Lundqvist G, Wide L, Hällgren R, Lundkvist G, Hallgren R: **Impaired glucose handling in active rheumatoid arthritis: effects of corticosteroids and antirheumatic treatment.** *Metabolism* 1987, **36**:944–8.
36. Penesová A, Rádiková Z, Vlček M, Kerlik J, Lukáč J, Rovenský J, Imrich R: **Chronic inflammation and low-dose glucocorticoid effects on glucose metabolism in premenopausal females with rheumatoid arthritis free of conventional metabolic risk factors.** *Physiol Res* 2013, **62**:75–83.
37. Sabio JM, Vargas-Hitos JA, Navarrete N, Hidalgo-Tenorio C, Jiménez-Alonso J: **Effects of low or medium-dose of prednisone on insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus.** *Clin Exp Rheumatol* , **28**:483–9.
38. Tam L-S, Tomlinson B, Chu TT, Li TK, Li EK: **Impact of TNF inhibition on insulin resistance and lipids levels in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Rheumatol* 2007, **26**:1495–8.
39. Moller DE: **Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes.** *Trends Endocrinol Metab* 2000, **11**:212–7.
40. Hayakawa T, Nagai Y, Taniguchi M, Yamashita H, Takamura T, Abe T, Nomura G, Kobayashi K: **Tumor necrosis factor-beta gene NcoI polymorphism decreases insulin resistance in Japanese men.** *Metabolism* 2000, **49**:1506–9.
41. Singh J a, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, Bridges SL, Chatham WW, Paulus HE, Suarez-Almazor M, Bombardier C, Dougados M, Khanna D, King CM, Leong AL, Matteson EL, Schousboe JT, Moynihan E, Kolba KS, Jain A, Volkman ER, Agrawal H, Bae S, Mudano AS, Patkar NM, Saag KG: **2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012, **64**:625–39.
42. Lo J, Bernstein LE, Canavan B, Torriani M, Jackson MB, Ahima RS, Grinspoon SK: **Effects of TNF-alpha neutralization on adipocytokines and skeletal muscle adiposity in the metabolic syndrome.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **293**:E102–E109.

43. Grattendick KJ, Nakashima JM, Feng L, Giri SN, Margolin SB: **Effects of three anti-TNF-alpha drugs: etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF-alpha in medium and TNF-alpha associated with the cell in vitro.** *Int Immunopharmacol* 2008, **8**:679–87.
44. Bhatia A, Kast RE: **Tumor necrosis factor ( TNF ) can paradoxically increase on etanercept treatment , occasionally contributing to TNF-mediated disease .** *The Journal of Rheumatology is a monthly international serial edited by Earl D . Silverman featuring research articles o. J Rheumatol* 2007, **34**.
45. Biniecka M, Kennedy A, Ng CT, Chang TC, Balogh E, Fox E, Veale DJ, Fearon U, O'Sullivan JN: **Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:R121.
46. Den Broeder AA, Wanten GJA, Oyen WJG, Naber T, van Riel PLCM, Barrera P: **Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2003, **30**:232–7.
47. Stagakis I, Bertias G, Karvounaris S, Kavousanaki M, Virla D, Raptopoulou A, Kardassis D, Boumpas DT, Sidiropoulos PI: **Anti-tumor necrosis factor therapy improves insulin resistance, beta cell function and insulin signaling in active rheumatoid arthritis patients with high insulin resistance.** *Arthritis Res Ther* 2012, **14**:R141.
48. Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Panoulas VF, Nightingale P, Koutedakis Y, Kitas GD: **Anti-tumour necrosis factor alpha therapy improves insulin sensitivity in normal-weight but not in obese patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2012, **14**:R160.
49. Biemond P, Swaak AJ, Koster JF: **Protective factors against oxygen free radicals and hydrogen peroxide in rheumatoid arthritis synovial fluid.** *Arthritis Rheum* 1984, **27**:760–5.
50. Woo C-H, Kim T-H, Choi J-A, Ryu H-C, Lee JE, You H-J, Bae Y-S, Kim J-H: **Inhibition of receptor internalization attenuates the TNFalpha-induced ROS generation in non-phagocytic cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **351**:972–8.
51. Schulze-Osthoff K, Krammer PH: **Divergent signalling via APO-1 / Fas and the TNF receptor , two homologous molecules involved in physiological cell death.** *EMBO J* 1994, **13**:4587–4596.
52. Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ, Matsushima K: **Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation.** *FASEB J* 1993, **7**(February):361–368.
53. Miesel R, Murphy MP, Kröger H: **Enhanced mitochondrial radical production in patients which rheumatoid arthritis correlates with elevated levels of tumor necrosis factor alpha in plasma.** *Free Radic Res* 1996, **25**:161–9.
54. Mur E, Zabernigg A, Hilbe W, Eisterer W, Halder W, Thaler J: **Oxidative burst of neutrophils in patients with rheumatoid arthritis: influence of various cytokines and medication.** *Clin Exp Rheumatol* 1997, **15**:233–237.

55. Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V: **Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interleukin-1.** *Biochem Pharmacol* 2000, **59**:7–11.
56. Coaccioli S, Panaccione A, Biondi R, Sabatini C, Landucci P, Del Giorno R, Fantera M, Monno Mondo A, Di Cato L, Paladini A, Fatati G, Puxeddu A: **Evaluation of oxidative stress in rheumatoid and psoriatic arthritis and psoriasis.** *Clin Ter* 2009, **160**:467–72.

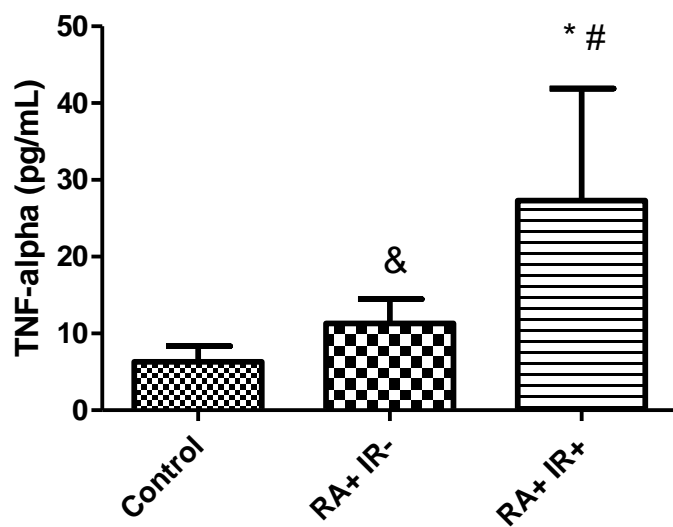


Figure 1 - Plasma TNF- $\alpha$  levels in healthy subjects (controls) and in patients with rheumatoid arthritis with (IR+) or without (IR-) insulin resistance .

Kruskal-Wallis test with Dunn`s post test. \* IR+ vs control,  $p < 0.0001$ ; & IR- vs control,  $p < 0.01$ ; # IR+ vs IR-;  $p < 0.05$ .

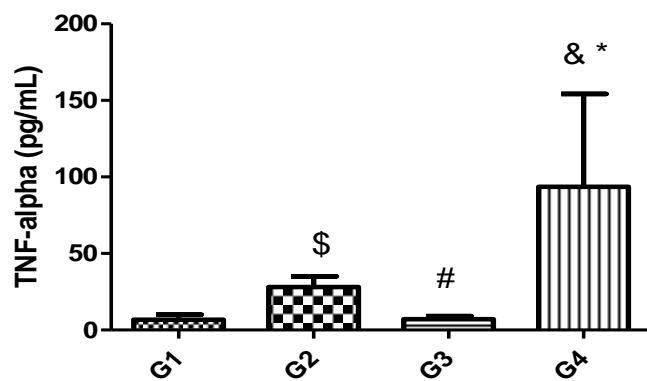


Figure 2 -- Plasma TNF- $\alpha$  levels in patients with rheumatoid arthritis with (IR+) or without (IR-) insulin resistance and using (TNF+) or not (TNF-) anti-TNF- $\alpha$ . Kruskal-Wallis test with Dunn's post test.

G1: IR-TNF-, G2: IR-TNF+, G3: IR+TNF-, G4: IR+TNF+

\* G4 vs G1,  $p < 0.0001$ ; & G4 vs G3,  $p < 0.0001$ ; \$ G2 vs G1,  $p < 0.0001$ ; # G2 vs G3,  $p < 0.01$ .

Table 1 - Clinical and laboratory data in patients with rheumatoid arthritis with (RI+) or without (RI-) insulin resistance.

	<b>IR – (n= 91)</b>	<b>IR+ (n= 82)</b>	<b>p</b>
Disease Duration (years)	11.0 (5.0-18.3)	8.0 (4.0-20.3)	NS
RF (IU/mL)	48.3 (0.0-125.0)	26.9 (0.0-118.2)	NS
Anti-CCP (U/mL)	25.55 (0.13-120.10)	6.65 (0.50-131.40)	NS
DAS28	3.51 (2.39-4.49)	3.76 (2.85-4.78)	<b>0.043</b>
DAS28 (%)			
Remission (<2,6)	27 (29.7% )	16 (19.5%)	<b>0.001</b>
Low (2,6 –3,2)	12 (13.2%)	11 (13.4%)	
Moderate (3,2-5,1)	42 (46.1%)	39 (47.6%)	
High (>5,1)	10 (10.0%)	16 (19.5%)	
CPR (mg/L)	3.52 (1.31-12.38)	6.35 (2.51-11.08)	<b>0.040</b>
ESR (mm)	14.0 (6.0-22.0)	19.5 (9.3-35.5)	<b>0.023</b>
<b>Therapy</b>			
Prednisone (Y/N)	64/27	54/28	NS
Antimalarials (Y/N)	38/53	32/50	NS
Anti-TNF $\alpha$ (Y/N)	20/71	19/63	NS
Adalimumab	7	6	NS
Etanercept	13	13	
Methotrexate (Y/N)	57/34	62/20	NS
Leflunomide (Y/N)	40/51	35/47	NS

Chi-square test with Yates correction. Kruskal-Wallis test with Dunn`s post test. Y, yes; N, no; RF, Rheumatoid Factor; anti-CCP, anti-cyclic citrullinated peptide antibody ; DAS 28, disease activity score evaluating 28 joints; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; NS, not significant

Table 2- Demographic, anthropometric and metabolic profile in healthy subjects (controls) and in patients with rheumatoid arthritis (RA) with or without insulin resistance (IR).

	Controls (n = 97)	RA+ IR- (n = 91)	RA+ IR+ (n = 82)	Control vs RA+ IR-	Control vs RA+ IR+	RA+ IR- vs RA+ IR+
Gender (F/M)	80/17	70/21	70/12	NS	NS	NS
Caucasian/not Caucasian	72/25	58/33	53/29	NS	NS	NS
Age (years)	51.0 (42.5-69.5)	56.0 (46.0-63.3)	57.5 (48.8-62.3)	NS	NS	NS
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25.8 (23.8-28.0)	25.9 (22.8-29.3)	29.4 (25.3-33.4)	NS	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
WC (cm)	91.5 (87.0-97.3)	90.0 (82.0-97.3)	98.0 (91.0-107.3)	NS	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Glucose (mg/dL)	87.0 (82.8-95.0)	85.0 (80.0-90.0)	96.0 (88.9-113.0)	NS	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Insulin ( $\mu$ U/mL)	6.35 (4.60-8.03)	6,70 (5.30- 8.10)	13.95 (11.10-16.78)	NS	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
HOMA-IR	1.35 (1.01-1.69)	1.42 (1.07-1.75)	3.41 (2.71-4.46)	NS	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>

Kruskal-Wallis test with Dunn`s post test. Data are expressed median (25%-75%). BMI, body mass index; WC, waist circumference; HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance; NS: not significant

Table 3 - Oxidative stress markers in healthy subjects (controls) and in patients with rheumatoid arthritis (RA) with or without insulin resistance (IR)

	Controls (n = 97)	RA+ IR- (n = 91)	RA+ IR+ (n = 82)	Control vs RA+ IR-	Control vs RA+ IR+	RA+ IR- vs RA+IR+
CL-LOOH (RLU)	166.7 (141.9-179.0)	169.2 (150.0-198.9)	166.2 (152.6-201.5)	NS	NS	NS
AOPP (umol/L of chloramines- T equivalents)	150.4 (118.4-209.6)	123.5 (100.4-171.3)	173.8 (123.9-238.7)	<b>&lt;0.05</b>	NS	<b>&lt;0.0001</b>
TRAP (μM Trolox/mg UA)	158.9 (122.2-200.9)	171.5 (146.1-207.9)	155.9 (121.0-177.3)	NS	NS	<b>&lt;0.05</b>
PAI	0.228 (0.166-0.321)	0,762 (0.578-0,952)	1.183 (0.753-1.680)	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.001</b>

Kruskal-Wallis test with Dunn`s post test. Data are expressed median (25%-75%). CL-LOOH, hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; RLU, relative luminescence units; AOPPs, advanced oxidation protein products; TRAP, total radical-trapping antioxidant parameter; PAI, pro-oxidant-antioxidant index.

Table 4 - Oxidative stress markers, disease activity and inflammatory parameters in patients with rheumatoid arthritis with (IR+) or without (IR-) insulin resistance and using (TNF+) or not (TNF-) anti-TNF- $\alpha$ .

	G1	G2	G3	G4
	(n=71)	(n=20)	(n=63)	(n=19)
CL-LOOH (RLU)	170.7 (150.0-196.7)	167.4 (147.2-214.4)	165.7 (152.7-204.3)	166.2 (151.8-166.2)
AOPP (umol/L of chloramines-T equivalents)	124.5 (102.6-170.1)	123.2 (99.9-182.8)	<b>173.3*</b> <b>(122.4-242.7)</b>	<b>173.8# &amp;</b> <b>(124.4-222.4)</b>
TRAP ( $\mu$ M Trolox/mg UA)	175.4 (147.3-210.0)	164.7 (131.8-207.7)	<b>150.8*</b> <b>(121.0-178.8)</b>	159.2 (107.5-176.6)
PAI	0.73 (0.57-0.92)	0.85 (0.62-1.12)	<b>1.21*</b> <b>(0.78-1.79)</b>	<b>1.18#&amp;</b> <b>(0.69-1.53)</b>
DAS28	3.41 (2.23-4.57)	3.83 (3.08-4.89)	3.75 (2.87-4.80)	3.49 (2.78-4.30)
CRP (mg/dL)	4.74 (1.26-15.80)	2.75 (1.78-6.76)	6.63 (7.70-11.9)	<b>4.66**</b> <b>(1.42-8.89)</b>
ESR (mm)	14.0 (5.0-22.0)	14.5 (8.3-23.0)	<b>19.0*</b> <b>(8.0-32.5)</b>	<b>26.0 &amp;#</b> <b>(11.0-44.0)</b>

Kruskall-Wallis with post test Dunn. Data are expressed median (25%-75%). G1, IR-TNF-; G2, IR-TNF+; G3, IR+TNF-; G4, IR+TNF+; CL-LOOH, Hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence; AOPP, Advanced Oxidation Protein Products; TRAP, Total radical-trapping antioxidant parameter; PAI, pro-oxidant-antioxidant index; DAS28, disease activity status evaluating 28 joints; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate

\*G1 vs G3, p<0.05; # G1 vs G4, p<0.05; & G4 vs G2, p<0.05; \*\* G4 vs G3

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo a demonstrar que a interação de RI e elevados níveis de TNF- $\alpha$  é importante fator envolvido no desequilíbrio redox em pacientes com AR e parece ser responsável pela manutenção do estado inflamatório e atividade da doença. Embora este seja um estudo transversal, que não permite estabelecer relação de causalidade, é concebível supor que o estresse oxidativo possa ser o link entre RI e o aumento de atividade da doença. As diferenças nos marcadores de estresse oxidativo nos pacientes com AR, com e sem RI contribuem para um futuro estudo com melhor delineamento, com a intervenção medicamentosa ou nutricional nesta população. Além disso, mais estudos são necessários para verificar se a presença da RI pode estar envolvida na falha terapêutica com inibidores de TNF- $\alpha$ . A compreensão das complexas interações entre estresse oxidativo, TNF- $\alpha$  e RI pode permitir o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para a AR.

## REFERÊNCIAS

1. Lee D, Weinblatt M: **Rheumatoid Arthritis**. *Lancet* 2001, **358**:903–911.
2. Klareskog L, Catrina AI PS: **Rheumatoid arthritis**. *Lancet* 2009, **373**:659–673.
3. Marques Neto JF et al.: **Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira**. *Rev bras Reum* 1993, **33**:169–73.
4. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard H a, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, et al.: **2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative**. *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:1580–8.
5. McInnes IB, Schett G: **The pathogenesis of rheumatoid arthritis**. *N Engl J Med* 2011, **365**:2205–19.
6. Del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante a: **High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors**. *Arthritis Rheum* 2001, **44**:2737–45.
7. Turesson C, O’Fallon W, Crowson C: **Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years**. *Ann Rheum Dis* 2003, **62**:722–727.
8. Del Val del Amo N, Ibanez Bosch R, Fito Manteca C, Gutierrez Polo R, Loza Cortina E: **Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: relation with disease aggressiveness**. *Clin Exp Rheumatol* , **24**:281–6.
9. Greiner A, Plischke H, Kellner H, Gruber R: **Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-citrullin antibodies, and IgM and IgA rheumatoid factors with serological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis**. *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1050**:295–303.
10. Serdaroğlu M, Cakirbay H, Değer O, Cengiz S, Kul S: **The association of anti-CCP antibodies with disease activity in rheumatoid arthritis**. *Rheumatol Int* 2008, **28**:965–70.
11. Predeteanu D, Varzaru L, Balenescu A, Bojinca V, Opris D, Vlad V, Berghea F, Abobului M, Constantinescu C, Ionescu R: **Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies--activity markers in rheumatoid arthritis**. *J Med Life* 2009, **2**:36–41.
12. Mota L, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-fronza LS, Bertolo MB, Victor M, Freitas C De, Antonio N, Louzada-júnior P, Dalva R, Giorgi N: **Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide**. *Rev Bras Reumatol* 2012, **52**:135–174.
13. Moller D, Flier J: **Insulin resistance - mechanisms, syndromes, and implications**. *N Engl J Med* 1991, **325**:938–948.
14. Ioannou: **Prevalence and trends of insulin resistance, impaired fasting glucose, and diabetes**. *J Diabetes Complications* 2007, **21**:363–370.

15. Mantzoros C: **Insulin resistance: Definition and clinical spectrum.** *UpToDate* 2013.
16. Luca C De, Olefsky JM: **Inflammation and Insulin Resistance.** *FEBS Lett* 2009, **582**:97–105.
17. Brennan A, Mantzoros C: **Leptin and adiponectin: their role in diabetes.** *Curr Diab Rep* 2007, **7**:1–2.
18. Ascaso J, Pardo S, Real J, Lorente R, Priego A, Carmena R: **Diagnosing Insulin Resistance by Simple Quantitative Methods in Subjects With Normal Glucose Metabolism.** *Diabetes Care* 2003, **26**:3320–3325.
19. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M: **Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity.** *Diabetes Care* 2000, **23**:57–63.
20. Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Furuta M, Araki-Sasaki R, Hori Y, Yano Y, Adachi Y: **Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 2001, **24**:362–5.
21. El-Barbary AM, Kassem EM, El-Sergany MAS, Essa SA-M, Eltomey MA: **Association of anti-modified citrullinated vimentin with subclinical atherosclerosis in early rheumatoid arthritis compared with anti-cyclic citrullinated peptide.** *J Rheumatol* 2011, **38**:828–34.
22. Ye J: **Regulation of PPAR $\gamma$  function by TNF $\alpha$ .** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **374**:405–408.
23. Dessein PH, Joffe BI: **Insulin resistance and impaired beta cell function in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:2765–75.
24. Chung CP, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Avalos I, Sokka T, Raggi P, Pincus T, Stein CM: **Inflammation-associated insulin resistance: differential effects in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus define potential mechanisms.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:2105–12.
25. Svenson KL, Lundqvist G, Wide L, Hällgren R, Lundkvist G, Hallgren R: **Impaired glucose handling in active rheumatoid arthritis: effects of corticosteroids and antirheumatic treatment.** *Metabolism* 1987, **36**:944–8.
26. Dessein P, Tobias M, Veller M: **Metabolic syndrome and subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2006, **33**:2425–32.
27. La Montagna G, Cacciapuoti F, Buono R, Manzella D, Mennillo GA, Arciello A, Valentini G, Paolisso G: **Insulin resistance is an independent risk factor for atherosclerosis in rheumatoid arthritis.** *Diab Vasc Dis Res* 2007, **4**:130–5.
28. Garcia Diaz J, Guzman A, Monzo L, Quintana E: **Significado de la resistencia a la insulina en la enfermedad vascular asociada a la artritis reumatoide.** *Med Clin (Barc)* 2008, **130**:197–8.
29. Mirjafari H, Farragher TM, Verstappen SMM, Yates A, Bunn D, Marshall T, Lunt M, Symmons DPM, Bruce IN: **Seropositivity is associated with insulin resistance in patients with early**

**inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Register (NOAR): an observational study.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:R159.

30. AbouAssi H, Tune KN, Gilmore B, Bateman L a, McDaniel G, Muehlbauer M, Huebner JL, Hoenig HM, Kraus VB, St Clair EW, Kraus WE, Huffman KM: **Adipose Depots, Not Disease-related Factors, Account for Skeletal Muscle Insulin Sensitivity in Established and Treated Rheumatoid Arthritis.** *J Rheumatol* 2014.

31. Pamuk ON, Unlü E, Cakir N: **Role of insulin resistance in increased frequency of atherosclerosis detected by carotid ultrasonography in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2006, **33**:2447–52.

32. Arcaro G: **Insulin Causes Endothelial Dysfunction in Humans: Sites and Mechanisms.** *Circulation* 2002, **105**:576–582.

33. Santos C, Tanaka L, Wosniak Jr J, Laurindo F: **Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial Santos, C. X., Tanaka, L. Y., Wosniak Jr, J., & Laurindo, F. R. (2009). Mechanisms and im.** *Antioxidants & redox signaling*, *11*(10), 2409-2427 2009, **11**:2409–27.

34. Halliwell B, Chirico S: **Lipid peroxidation : its mechanism , measurement and significance.** *Am J Clin Nutr* 1993, **57**(suppl):715S–25S.

35. FL K, T M, Kiechle FL, Malinski T: **Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection.** *Am J Clin Pathol* 1993, **100**:567–75.

36. Heliovaara M, Knekt P, Aho K, Aaran R, Alfthan G, Aromaa A: **Serum oxidants and risk of rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 1994, **53**:51–53.

37. Paredes S, Girona J, Hurt-Carnejo E, Vallve J, Olive S, Heras M, Benito P, Masana L: **Antioxidants vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: association with inflammatory markers.** *J Rheumatol* 2002, **29**:2271–2277.

38. Balbir-Gurman A, Fuhrman B, Braun-Moscovici Y, Markovits D, Aviram M: **Consumption of pomegranate decreases serum oxidative stress and reduces disease activity in patients with active rheumatoid arthritis: a pilot study.** *Isr Med Assoc J* 2011, **13**:474–9.

39. Ishibashi T, Sato B, Rikitake M, Seo T, Kurokawa R, Hara Y, Naritomi Y, Hara H, Nagao T: **Consumption of water containing a high concentration of molecular hydrogen reduces oxidative stress and disease activity in patients with rheumatoid arthritis: an open-label pilot study.** *Med Gas Res* 2012, **2**:27.

40. Ozkan Y, Yardým-Akaydýn S, Sepici A, Keskin E, Sepici V, Simsek B: **Oxidative status in rheumatoid arthritis.** *Clin Rheumatol* 2007, **26**:64–8.

41. Desai P, Manjunath S, Kadi S, Chetana K, Vanishree J: **Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010, **14**:959–67.

42. Gringhuis SI, Leow a., Papendrecht-van der Voort E a. M, Remans PHJ, Breedveld FC, Verweij CL: **Displacement of Linker for Activation of T Cells from the Plasma Membrane Due to Redox**

**Balance Alterations Results in Hyporesponsiveness of Synovial Fluid T Lymphocytes in Rheumatoid Arthritis.** *J Immunol* 2000, **164**:2170–2179.

43. Schalkwijk J, van der Berg W, van de Putte L, Joosten L: **An experimental model for hydrogen peroxide-induced tissue damage. Effects of a single inflammatory mediator on (peri)articular tissues.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**:532–538.

44. Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg L-O, Kan YW, Chan K, Hassenpflug J, Freitag-Wolf S, Varoga D, Lippross S, Pufe T: **Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**:844–50.

45. Hitchon CA, El-Gabalawy HS: **Oxidation in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2004, **6**:265–278.

46. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV: **Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2003, **5**:R234–40.

47. Goldring SR, Gravalles EM: **Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2000, **12**:195–9.

48. Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, Mentlein R: **Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor.** *Am J Pathol* 2004, **164**:185–92.

49. Coimbra IB, Jimenez S a, Hawkins DF, Piera-Velazquez S, Stokes DG: **Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**:336–45.

50. Den Broeder AA, Wanten GJA, Oyen WJG, Naber T, van Riel PLCM, Barrera P: **Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2003, **30**:232–7.

51. Biniecka M, Kennedy A, Ng CT, Chang TC, Balogh E, Fox E, Veale DJ, Fearon U, O'Sullivan JN: **Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:R121.

52. Hirao M, Yamasaki N, Oze H, Ebina K, Nampei A, Kawato Y, Shi K, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J: **Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab.** *Rheumatol Int* 2012, **32**:4041–5.

53. Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A: **Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatol Int* 2008, **28**:245–51.

54. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N: **Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Biochem* 2007, **40**:167–71.

55. Kageyama Y, Takahashi M: **Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF-alpha antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Rheumatol* 2008, **26**:73–80.

56. Shahmohamdnejad S, Vaisi-Raygani A, Shakiba Y, Kiani A, Rahimi Z, Pourmotabbed T: **Association between butyrylcholinesterase activity and phenotypes, paraoxonase192 rs662 gene polymorphism and their enzymatic activity with severity of rheumatoid arthritis: Correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress, preliminary.** *Clin Biochem* 2014.
57. Nakajima A, Aoki Y, Shibata Y, Sonobe M, Terajima F, Takahashi H, Saito M, Taniguchi S, Yamada M, Nakagawa K: **Identification of clinical parameters associated with serum oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis.** *Mod Rheumatol* 2014.
58. Kaneki M, Shimizu N, Yamada D, K C: **Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance.** *Antioxid Redox Signal* 2007, **9**:319–329.
59. Lozovoy MAB, Simão ANC, Oliveira SR, Iryioda TM V, Panis C, Cecchini R, Dichi I: **Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus.** *Scand J Rheumatol* 2013, **42**:303–10.
60. Lee H-J, Jang HB, Park JE, Park K-H, Kang JH, Park SI, Song J: **Relationship between Serum Levels of Body Iron Parameters and Insulin Resistance and Metabolic Syndrome in Korean Children.** *Osong public Heal Res Perspect* 2014, **5**:204–10.
61. Li J, Wang R, Luo D, Li S, Xiao C: **Association between serum ferritin levels and risk of the metabolic syndrome in Chinese adults: a population study.** *PLoS One* 2013, **8**:e74168.
62. Kim C-H, Kim H-K, Bae SJ, Park J-Y, Lee K-U: **Association of elevated serum ferritin concentration with insulin resistance and impaired glucose metabolism in Korean men and women.** *Metabolism* 2011, **60**:414–20.
63. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, Vanni E, Fargion S: **Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study.** *Am J Gastroenterol* 2007, **102**:1251–8.
64. Fernandez R, Penaroja G, Castro A: **Blood letting in high ferritin type 2 diabetes.** *Diabetes* 2002, **51**(April).
65. Anderson E, Lustig M, Boyle C, Woodlief T, Kane D, Lin C-T, Price W, Kang L, Rabinovitch P, Szeto H, Houmard J, Cortright R, Wasserman D, Neuffer P: **Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodent and humans.** *J Clin Invest* 2009, **119**:573–581.
66. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM: **Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes.** *Free Radic Biol Med* 2011, **51**:993–9.
67. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM-E, Clark SE, Morris EM, Szary N, Manrique C, Stump CS: **Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells.** *J Biol Chem* 2006, **281**:35137–46.
68. Haffner S, Miettinen H, Stern M: **The Homeostasis Model in San Antonio Heart Study.** *Diabetes Care* 1997, **20**:1087–92.
69. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S: **Oxidative stress in blood of HIV infected patients.** *Clin Chim Acta* 1996, **255**:107–17.

70. Yokozawa T, Cho EJ, Hara Y, Kitani K: **Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride.** *J Agric Food Chem* 2000, **48**:5068–5073.
71. Simão ANC, Dichi JB, Barbosa DS, Cecchini R, Dichi I: **Influence of uric acid and gamma-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome.** *Nutrition* 2008, **24**:675–81.
72. Venturini D, Simão ANC, Sripes N a, Bahls LD, Melo P a S, Belinetti FM, Lozovoy M a B, Dichi I: **Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome.** *Obesity (Silver Spring)* 2012, **20**:2361–6.
73. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B: **Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure.** *J Immunol* 1998, **161**:2524–32.
74. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A: **Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle.** *Free Radic Biol Med* 1991, **10**:93–100.
75. Sebeková K, Boor P, Valachovicová M, Blazíček P, Parrák V, Babinská K, Heidland A, Krajcovicová-Kudláčková M: **Association of metabolic syndrome risk factors with selected markers of oxidative status and microinflammation in healthy omnivores and vegetarians.** *Mol Nutr Food Res* 2006, **50**:858–68.
76. Zurawska-Plaksej E, Grzebyk E, Marciniak D, Szymańska-Chabowska a, Piwowar a: **Oxidatively modified forms of albumin in patients with risk factors of metabolic syndrome.** *J Endocrinol Invest* 2014, **37**:819–27.
77. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B: **Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.** *Kidney Int* 1996, **49**:1304–13.
78. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Domínguez C: **Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications.** *Free Radic Biol Med* 2003, **34**:1563–74.
79. Simão TNC, Lozovoy MAB, Simão ANC, Oliveira SR, Venturini D, Morimoto HK, Miglioranza LHS, Dichi I: **Reduced-energy cranberry juice increases folic acid and adiponectin and reduces homocysteine and oxidative stress in patients with the metabolic syndrome.** *Br J Nutr* 2013, **110**:1885–94.

## ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos 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

**CEP:** 86.038-440

**UF:** PR **Município:** LONDRINA

**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/UEL): 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      **CEP:** 86.038-440  
**Telefone:** (43)3371-2490      **E-mail:** cep268@uel.br

## ANEXO B

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Artrite Reumatoide

#### 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 participara 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 reumatóide (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 reumatóide, 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. Isaías Dichi

## ANEXO C

## FICHA DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE

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

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

IDADE OU Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Sexo : ( ) feminino ( ) masculino

Etnia: ( ) caucasiano ( ) não caucasiano

TEMPO DE DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_

DAS 28: VHS \_\_\_\_\_ PCR \_\_\_\_\_

Comprometimento sistêmico extra-articular:

Pulmonar ( ) vasculite ( ) nódulos reumatóides ( ) cardíaco ( ) SNC ( )

Outras doenças:

HAS ( ) DM ( ) dislipidemia ( ) IAM ( ) AVC ( ) tireóide ( ) ,

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

## MEDICAÇÕES

( ) Prednisona dose : \_\_\_\_\_

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

( ) Hidroxicloroquina ou cloroquina dose : \_\_\_\_\_

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

( ) Leflunomida dose : \_\_\_\_\_

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

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

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

( ) Tocilizumabe dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Abatacepte dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Rituximabe dose : \_\_\_\_\_ início em : \_\_\_\_\_

( ) Ciclofosfamida : \_\_\_\_\_

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

Tabagismo : ( ) sim ( ) não

Atividade física sim ( ) não ( )

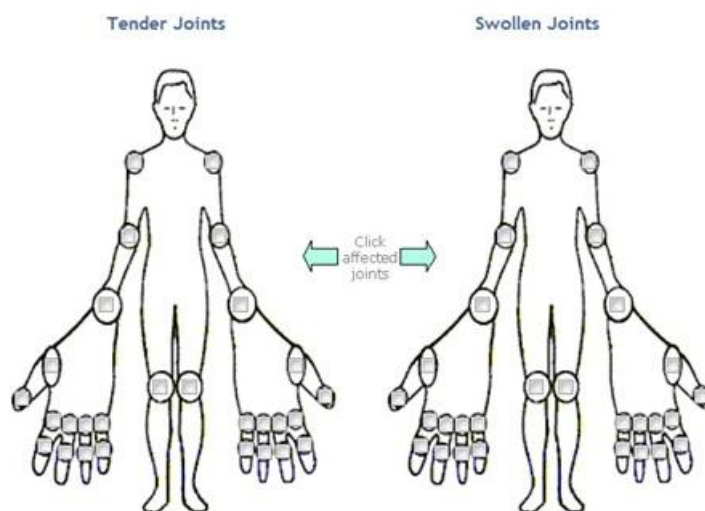
Tipo: \_\_\_\_\_ frequência : \_\_\_\_\_ há quanto tempo: \_\_\_\_\_

## Dados antropométricos

Altura ( cm )	Peso ( kg )	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Circunferência abdominal ( cm )	Pressão arterial ( mmHg )

## ANEXO D

## AVALIAÇÃO DO DAS 28



## AVALIAÇÃO DA SAÚDE GLOBAL

Marque a opção em que você se encontra em relação à artrite reumatoide (dor, capacidade funcional) considerando os últimos 7 dias:



## ANEXO E

### Instruções para autores



### Instructions for authors

#### Research articles

See '[About this journal](#)' for descriptions of different article types and information about policies and the refereeing process.

#### Submission process

---

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *Arthritis Research & Therapy* levies an article-processing charge on all accepted Research articles; if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Arthritis Research & Therapy* prefers [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the '[About Arthritis Research & Therapy](#)' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of

the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor-in-Chief and/or Editorial Board members.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

#### **File formats**

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))

TeX/LaTeX users: Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeX stylefile if you use TeX format. During the TeX submission process, please submit your TeX file as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by internal staff as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF. For all TeX submissions, all relevant editable source must be submitted during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the publication procedures.

## Preparing main manuscript text

---

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

### Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *Arthritis Research & Therapy* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Article headings](#)
- [Introduction](#)
- [Methods](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Endnotes](#)
- [References](#)
- [Illustrations and figures](#) (if any)
- [Tables and captions](#)
- [Preparing additional files](#)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

### Title page

The title page should list

- the title of the article
- the full names
- institutional addresses

- email addresses for all authors

The corresponding author should also be indicated.

Please note that the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial" or "X is a risk factor for Y: a case control study". Please see the policy section in '[About Arthritis Research & Therapy](#)' for further details.

### **Abstract**

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Introduction**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications; **Trial registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the [CONSORT extension for abstracts](#).

Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Please see also our guide for writing an easily accessible [abstract](#).

### **Keywords**

Three to ten keywords representing the main content of the article.

### **Introduction**

The Introduction section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

### **Methods**

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the methods section.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in '[About this journal](#)'.

## **Results and discussion**

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

## **Conclusions**

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

## **List of abbreviations**

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

## **Competing interests**

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript. Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'. When completing your declaration, please consider the following questions:

### *Financial competing interests*

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an

organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.

- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

*Non-financial competing interests*

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

**Authors' contributions**

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to [ICMJE guidelines](#), An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

### **Authors' information**

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

### **Acknowledgements**

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

### **Endnotes**

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter)

should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

### **References**

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'..

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)
- [Zotero](#)

Examples of the *Arthritis Research & Therapy* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list

rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following

format: **The Mouse Tumor Biology**

**Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

**Examples of the *Arthritis Research & Therapy* reference style**

*Article within a journal*

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996,13:266-267.

*Article within a journal supplement*

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, 43(Suppl 3):149-170.

*In press article*

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

*Published abstract*

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, 42:s250.

*Article within conference proceedings*

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.* Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

*Book chapter, or article within a book*

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.**In *Origins of Plastids. Volume 2.* 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

*Whole issue of journal*

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, 10:1-72.

*Whole conference proceedings*

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

*Complete book*

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

*Monograph or book in a series*

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56.

[Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

*Book with institutional author*

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

*PhD thesis*

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

*Link / URL*

**The Mouse Tumor Biology**

**Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

*Link / URL with author(s)*

Corpas M: **The Crowdfunding Genome Project: a personal genomics community with open source values**

[<http://blogs.biomedcentral.com/bmcblog/2012/07/16/the-crowdfunding-genome-project-a-personal-genomics-community-with-open-source-values/>]

*Dataset with persistent identifier*

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*)**. *GigaScience*

*Database*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

*Clinical trial registration record with persistent identifier*

Mendelow, AD (2006): **Surgical Trial in Lobar Intracerebral Haemorrhage**.

Current Controlled Trials. <http://dx.doi.org/10.1186/ISRCTN22153967>

**Preparing illustrations and figures**

---

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a

single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

### **Formats**

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

*Arthritis Research & Therapy* will edit all figures supplied by the author. For this reason it is especially important that authors should supply figures in [vector form](#), to facilitate such editing.

### **Figure legends**

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

**Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.**

### **Display of Electrophoretic gels and blots**

Each gel and blot included in a figure or additional data file should display appropriate positive and negative controls in addition to molecular size markers and loading controls. Gel or blot images must not be electronically enhanced or manipulated. Any adjustments have to ensure that the final image is still a true representation of the original data.

Linear adjustment of the color, contrast or brightness are permitted, but they must be applied to the entire image, not just parts of it.

If gel or blots images have been cropped in order to improve the clarity of a figure, the cropping must be explained in the figure legend; any important bands must be included in the cropped figure. The complete gels and blots should be provided as additional data files and referred to from the legend of the corresponding figure in the main text.

If lanes are displayed together in an image that were not adjacent in the original gel, the lanes must be separated clearly by lines and a note must be added to the figure legend.

If previously characterized antibodies were used, a reference must be included in the article. If less well known reagents were used, antibody specificity and its reactivity in the actual assay should be included in the article.

If quantitative comparisons between samples shown on different gels or blots have to be made, this must be made explicit in the figure legends.

### **Preparing tables**

---

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format.

These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if

columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls ) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

### **Preparing additional files**

---

Although *Arthritis Research & Therapy* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to [editorial@arthritis-research.com](mailto:editorial@arthritis-research.com), quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Arthritis Research & Therapy* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the

Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.  
**Additional file formats**

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
  - PDF (Adode Acrobat)
- Animations
  - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
  - MP4 (MPEG 4)
  - MOV (Quicktime)
- Tabular data
  - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
  - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

### **Mini-websites**

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all

parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.

5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

## Style and language

### General

Currently, *Arthritis Research & Therapy* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

### Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

### Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

### Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *Arthritis Research & Therapy* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

### Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).