



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FABIANO APARECIDO DE MEDEIROS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR  
DE *NECROSE TUMORAL BETA* +252 G>A (rs909253) COM A  
PRESENÇA DE AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM  
ARTRITE REUMATOIDE**

---

Londrina  
2018

FABIANO APARECIDO DE MEDEIROS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO *FATOR*  
*DE NECROSE TUMORAL BETA* (rs909253) COM A  
PRESENÇA DE AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM  
ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy

Londrina  
2018

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

de Medeiros, Fabiano Aparecido .

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL BETA +252 G>A (rs909253) COM A PRESENÇA DE AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE / Fabiano Aparecido de Medeiros. - Londrina, 2018.

64 f. : il.

Orientador: Andrea Name Colado Simão.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2018.

Inclui bibliografia.

1. artrite reumatoide - Tese. 2. polimorfismo genético do fator de necrose tumoral beta +252 G>A - Tese. 3. TNF-? - Tese. 4. autoanticorpos - Tese. I. Simão, Andrea Name Colado . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

FABIANO APARECIDO DE MEDEIROS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO *FATOR DE  
NECROSE TUMORAL BETA* (rs909253) COM A PRESENÇA DE  
AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

***BANCA EXAMINADORA***

---

Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. José Wander Breganó  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 16 de março de 2018.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, minha esposa Ludmila, minha querida filha Maria Eugênia e minha melhor amiga Eryka Helena, que me apoiam nos momentos difíceis, me incentivam e dão forças para continuar a estudar e concluir mais uma etapa;

À minha mãe, por todas as condições que me proporcionou durante todos os anos de estudo;

À minha orientadora professora Dra. Andrea Name Colado Simão por todos os ensinamentos, a incrível paciência de orientar, além do carinho e atenção que me deu durante todo o tempo do mestrado;

Ao meu co-orientador Marcell Alysson Batisti Lozovoy, pelas correções e sugestões que enriqueceram muito nosso trabalho;

Um agradecimento especial para “chefa” Daniela Frizon Alfieri, que foi praticamente minha tutora nas práticas realizadas no laboratório, além de muitos conhecimentos teóricos para preparação desse trabalho, também aos meus colegas de turma Marcelo Cândido de Sá e Jair Gelinski, que hoje considero irmãos;

Para todos os discentes, tanto do mestrado quanto do doutorado que frequentaram o laboratório de pesquisa da imunologia durante minha permanência, com ressalvas para Bruna Miglioranza, sendo a pessoa que me ensinou a rotina do Trapp, Brunna Emanuela França Robles, a primeira companheira de coletas dos projetos, Bruno Alexandre Sekiguchi, parceiro semanal do projeto de espondilite, assim como a Dra Neide Tomimura Costa (melhor médica que já trabalhei), Naiara Lourenço Mari. Colaboraram de forma significativa para minhas pesquisas também as Dra Ana Paula Kallaur, Dra Elaine Regina Delicato de Almeida, Dra Edna Maria Vissoci Reiche, Tamires Flauzino, Nicole Perugini Stadtober, Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda, Lorena Flor, Luana Aparecida Cossentini;

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas, em especial aos setores de Imunologia Clínica, Diagnóstico Molecular, Bioquímica, Hematologia e Coletas do Hospital Universitário da UEL, pela colaboração durante o desenvolvimento desse trabalho;

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação de Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da UEL;

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro aos Projetos de Pesquisa Básica e Aplicada;

Aos pacientes que, voluntariamente, participaram do projeto de pesquisa, no qual norteou esse estudo, assim como, a confiança na nossa equipe de pesquisadores e entendimento da importância da realização deste estudo.

MEDEIROS, Fabiano Aparecido de. **Associação do polimorfismo genético do fator de necrose tumoral beta +252 G>A (rs909253) com a presença de autoanticorpos em pacientes com artrite reumatoide.** 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

**Introdução:** A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune potencialmente incapacitante, cujo desenvolvimento tem sido associado à exposição a certos fatores ambientais em indivíduos geneticamente predispostos. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é a principal citocina envolvida na fisiopatologia da AR, induzindo a inflamação sinovial e sistêmica. O fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ) é reconhecido basicamente pelos mesmos receptores que o TNF- $\alpha$ , e dessa forma eles apresentam efeitos similares. O TNF- $\beta$  é homólogo ao TNF- $\alpha$ , e estudos demonstram que o polimorfismo genético do TNF- $\beta$  (rs909253) pode estar relacionado a alterações na expressão do TNF- $\alpha$ , com consequente aumento na produção de sua citocina. Estudos indicam que o polimorfismo TNF- $\beta$  +252 G>A está associado a um maior risco de desenvolvimento de diversas doenças autoimunes, entre elas AR.

**Objetivo:** O presente estudo verificou a associação entre o polimorfismo do TNF- $\beta$  +252 G>A com a susceptibilidade à AR e a presença dos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, fator reumatoide (FR) e anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), assim como com os níveis séricos TNF- $\alpha$ .

**Métodos:** Esse é estudo caso-controle, incluindo 261 pacientes com AR e 297 controles, todos da mesma região geográfica. O diagnóstico de AR foi realizado de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatismo/Liga Europeia de Reumatologia, de 2010. A atividade da doença foi avaliada pelo *disease activity score in 28 joints*, utilizando a proteína C reativa (PCR) ou a velocidade de hemossimentação (VHS). O polimorfismo genético do TNF- $\beta$  foi determinado pela reação em cadeia da polimerase e polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) com identificação de três genótipos: B1/B1, B1/B2 e B2/B2. Foram avaliados os seguintes marcadores inflamatórios: contagem de leucócitos totais, VHS, níveis séricos de ferritina, PCR, FR, anti-CCP, e os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e o seus receptores 1 (TNFR1) e receptores 2 (TNFR2).

**Resultados:** Entre os pacientes, 42,1% apresentaram o alelo B2/B2, 47,9% B1/B2 e 10,0% B1/B1, resultando em uma frequência alélica de 66,0% para o alelo B2 e 34,0% para o alelo B1. Não foi observada diferença significativa na frequência alélica e na distribuição genotípica entre os grupos no modelo aditivo, assim como no modelo dominante ( $p>0,05$ ). Pacientes com o alelo B1 demonstraram aumento em 4,23 vezes a presença do FR ( $p=0,020$ ) e 8,13 vezes para o anti-CCP ( $p=0,001$ ), independentemente dos dados demográficos, clínicos e inflamatórios. Os pacientes que apresentaram o alelo B1, apresentaram maiores níveis de TNF- $\alpha$  e estes estavam associados com positividade do FR, anti-CCP ou ambos ( $p=0,040$ ,  $p=0,011$  e  $p=0,038$ , respectivamente). Porém, pacientes com alelo B2 em homozigose, a presença desses anticorpos não alteraram os níveis de TNF- $\alpha$  ( $p>0,05$ ). Os receptores sTNFR1 e sTNFR2 não diferiram de acordo com os genótipos ( $p>0,05$ ) e em com a presença de autoanticorpos. Para verificar quais parâmetros poderiam influenciar os níveis de TNF- $\alpha$  e a presença de autoanticorpos de acordo com o genótipos, foram realizadas três modelos de regressão linear (tipos *stepwise*) de acordo com os genótipos. O primeiro modelo de regressão foi realizado em pacientes com a presença de FR, foi demonstrado que em pacientes com o genótipo B2/B2, 20,4% da variação dos níveis de TNF- $\alpha$  podem ser explicados pelo DAS28-PCR. Já no genótipo B1/B1+B1/B2 37,2% da variação dos níveis de

TNF- $\alpha$  podem ser explicados pelos níveis de sTNFR1 e pela presença de FR. O segundo modelo de regressão foi realizado para pacientes com de anti-CCP, foi demonstrado que em pacientes com o genótipo B2/B2, 21,2% da variação dos níveis de TNF- $\alpha$  podem ser explicados pelo DAS28-PCR. Já com o genótipo B1/B1+B2/B2, 39,7% da variação dos níveis de TNF- $\alpha$  podem ser explicados pelos níveis de sTNFR1 e pela presença de anti-CCP. O terceiro modelo de regressão foi realizado em pacientes com a presença de FR e anti-CCP, foi demonstrado que em pacientes com o genótipo B2/B2, 21,2% da variação dos níveis de TNF- $\alpha$  podem ser explicados pelo DAS28-PCR. . Já com o genótipo B1/B1+B2/B2, 42,8% da variação dos níveis de TNF- $\alpha$  podem ser explicados pelos níveis de sTNFR1 e pela presença de FR e/ ou anti-CCP.

**Conclusão:** Nossos resultados indicam que o polimorfismo *TNF- $\beta$*  +252 G>A não está associado com a susceptibilidade à AR e níveis de TNF- $\alpha$ , mas sim com a presença ou níveis de autoanticorpos. Além disso, a presença do FR, anti-CCP ou ambos podem modular os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  apenas em pacientes com o alelo B1, independentemente da atividade da doença.

**Palavra-chave:** Artrite reumatoide. Polimorfismo genético do *fator de necrose tumoral beta* +252 G>A. rs909253. TNF- $\alpha$ . Fator reumatoide. Anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico.

MEDEIROS, Fabiano Aparecido de. **Association of genetic polymorphism of tumor necrosis factor beta +252 g>a (rs909253) with the presence of autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis.** 2018. 62 pp. Dissertation (Master in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

**Background:** Rheumatoid arthritis (RA) is a potentially disabling autoimmune disease, and its development has been associated with exposure to certain environmental factors in genetically predisposed individuals. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) is the major cytokine involved in the pathophysiology of RA, inducing synovial and systemic inflammation. Tumor necrosis factor beta (TNF- $\beta$ ) is recognized by the same receptors as TNF- $\alpha$ , and thus they have similar effects. *TNF- $\beta$*  is homologous to *TNF- $\alpha$* , and studies shows that the genetic polymorphism of *TNF- $\beta$*  +252 G>A may be related to changes in *TNF- $\alpha$*  expression, with consequent increase in the production of its cytokine. Studies indicate that the *TNF- $\beta$*  polymorphism +252 G>A is associated with a higher risk of development of several autoimmune diseases.

**Objective:** the aim of the present study was to evaluate the association between the *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism with the susceptibility for RA and presence of diagnostic and prognostic biomarkers rheumatoid factor (RF) and Anti-Cyclic Citrullinated Peptide (anti-CCP), as well as with the serum tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ).

**Method:** This is a case-control study, including 261 RA patients and 297 controls, all from the same geographic region. The diagnosis of RA was performed according to the criteria of the American College of Rheumatology / European League of Rheumatology, 2010. Disease activity was assessed by disease activity score in 28 joints using either C-reactive protein (CRP) or weaning rate (ESR). Genetic polymorphism of TNF- $\beta$  was determined by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) with identification of three genotypes: B1 / B1, B1 / B2 and B2 / B2. The following inflammatory markers were counted: total leukocyte count, HSV, serum ferritin levels, CRP, RF, anti-CCP, and plasma levels of TNF- $\alpha$  and its receptor 1 (TNFR1) and receptor 2 (TNFR2).

**Results:** Among the patients, 42.1% presented the B2 / B2 allele, 47.9% B1 / B2 and 10.0% B1 / B1, resulting in an allelic frequency of 66.0% for the B2 allele and 34.0% for the B1 allele. No significant difference in allele frequency and genotypic distribution was observed between groups in the additive model, as well as in the dominant model ( $p > 0.05$ ). Patients with the B1 allele showed a 4.23-fold increase in the presence of RF ( $p = 0.020$ ) and 8.13-fold in the anti-CCP ( $p = 0.001$ ), regardless of demographic, clinical and inflammatory data. Patients who presented the B1 allele had higher levels of TNF- $\alpha$  and these were associated with RF positivity, anti-CCP or both ( $p = 0.040$ ,  $p = 0.011$  and  $p = 0.038$ , respectively). However, patients with B2 allele in homozygosis, the presence of these antibodies did not alter TNF- $\alpha$  levels ( $p > 0.05$ ). The sTNFR1 and sTNFR2 receptors did not differ according to genotypes ( $p > 0.05$ ) and enm with the presence of autoantibodies. To verify which parameters could influence TNF- $\alpha$  levels and the presence of autoantibodies according to the genotypes, three linear regression models (stepwise types) were performed according to the genotypes. The first regression model was performed in patients with the presence of RF, it was demonstrated that in patients with the B2 / B2 genotype, 20.4% of the variation of TNF- $\alpha$  levels can be explained by DAS28-PCR. In the genotype B1 / B1 + B1 / B2, 37.2% of the variation in levels of TNF- $\alpha$  can be explained by sTNFR1 levels and the presence of RF. The second regression model was performed for patients with anti-CCP, it was demonstrated that

in patients with the B2 / B2 genotype, 21.2% of the variation of TNF- $\alpha$  levels can be explained by DAS28-PCR. With the B1 / B1 + B2 / B2 genotype, 39.7% of the variation of TNF- $\alpha$  levels can be explained by sTNFR1 levels and the presence of anti-CCP. The third regression model was performed in patients with the presence of RF and anti-CCP, it was demonstrated that in patients with the B2 / B2 genotype, 21.2% of the variation of TNF- $\alpha$  levels can be explained by DAS28-PCR. With the B1 / B1 + B2 / B2 genotype, 42.8% of the variation of TNF- $\alpha$  levels can be explained by sTNFR1 levels and the presence of RF and / or anti-CCP.

**Conclusion:** Our results indicate that the TNF- $\beta$  +252 G>A polymorphism is not associated with susceptibility to RA and TNF- $\alpha$  levels, but rather to the presence or levels of autoantibodies. In addition, the presence of RF, anti-CCP or both may modulate TNF- $\alpha$  plasma levels only in patients with the B1 allele, regardless of disease activity.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis. *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism . Rs909253. Rheumatoid factor. Anti-Cyclic Citrullinated Peptide.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
AR	Artrite Reumatoide
ANTI-CCP	Anticorpos Antipeptídeo Citrulinado Cíclico
DMARD	Drogas modificadoras do curso da doença reumática
DNA	<i>Desoxiribunucleic acid</i> (Ácido desoxiribonucleico)
dNT	<i>Deoxynucleotide</i> (Deoxinucleotídeo)
DP	Desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
FR	Fator Reumatóide
GLM	<i>Multivariate general linear model</i> (Análise multivariada linear)
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> (Estudos genômicos de associação)
HLA	Antígeno leucocitário humano
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corporal
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
LTA	Linfotoxinas A
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
OR	Odds ratio (razão de chance)
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PCR	Proteína C reativa
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)

RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição)
RNAm	<i>Ribonucleic acid messenger</i> (Ácido ribonucléico mensageiro)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de um único nucleotídeo)
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i> (Fator de necrose tumoral)
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis fator -<math>\alpha</math></i> (Fator de necrose tumoral - $\alpha$ )
TNF- $\beta$	<i>Tumor necrosis fator-<math>\beta</math></i> (Fator de necrose tumoral- $\beta$ )
sTNFR1	<i>Soluble Tumor necrosis fator receptor 1</i> (Receptor 1 solúvel do Fator de necrose tumoral)
sTNFR2	<i>Soluble Tumor necrosis fator receptor 2</i> (Receptor 2 solúvel do Fator de necrose tumoral)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta
VHC	Vírus da hepatite C
VHS	Velocidade de hemossedimentação

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatismo/Liga Europeia de Reumatologia de 2010 para Artrite Reumatoide .....	16
<b>Tabela 2</b> - Índice da atividade da artrite reumatoide pelo <i>disease activity score in 28 joints</i> -velocidade de hemossimentação.....	17

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fatores envolvidos no desenvolvimento de artrite reumatoide ..... 14
- Figura 2** - Articulação normal (a) e articulação afetada por artrite reumatoide (b):  
hipercelularidade e destruição articular ..... 15
- Figura 3** - O papel imunológico do fator reumatoide na artrite reumatoide..... 18

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>Artrite Reumatoide</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>Fator Reumatoide e Artrite Reumatoide</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>Anti-CCP e AR</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4</b>	<b>Envolvimento de Fator de Necrose Tumoral na fisiopatologia da AR</b> .....	<b>11</b>
<b>1.5</b>	<b>Polimorfismo do fator de necrose tumoral-<math>\beta</math> (TNF—<math>\beta</math>)</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>SUJEITOS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>Aspectos Éticos</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento do estudo</b> .....	<b>18</b>
<b>4.3</b>	<b>Medidas Antropométricas</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4</b>	<b>Exames Laboratoriais</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Coleta de sangue</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Marcadores Imunológicos e Inflamatórios</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4.3</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math> e os receptores sTNFR1 e sTNFR2</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Polimorfismo genético NcoI do TNF-<math>\beta</math></b> .....	<b>20</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>44</b>

<b>10</b>	<b>ANEXOS E APÊNDICES .....</b>	<b>51</b>
	<b>Anexo A. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina. ....</b>	<b>51</b>
	<b>Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>	<b>53</b>
	<b>Apêndice B. Ficha de avaliação dos pacientes com Artrite Reumatoide.....</b>	<b>55</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1. Artrite Reumatoide

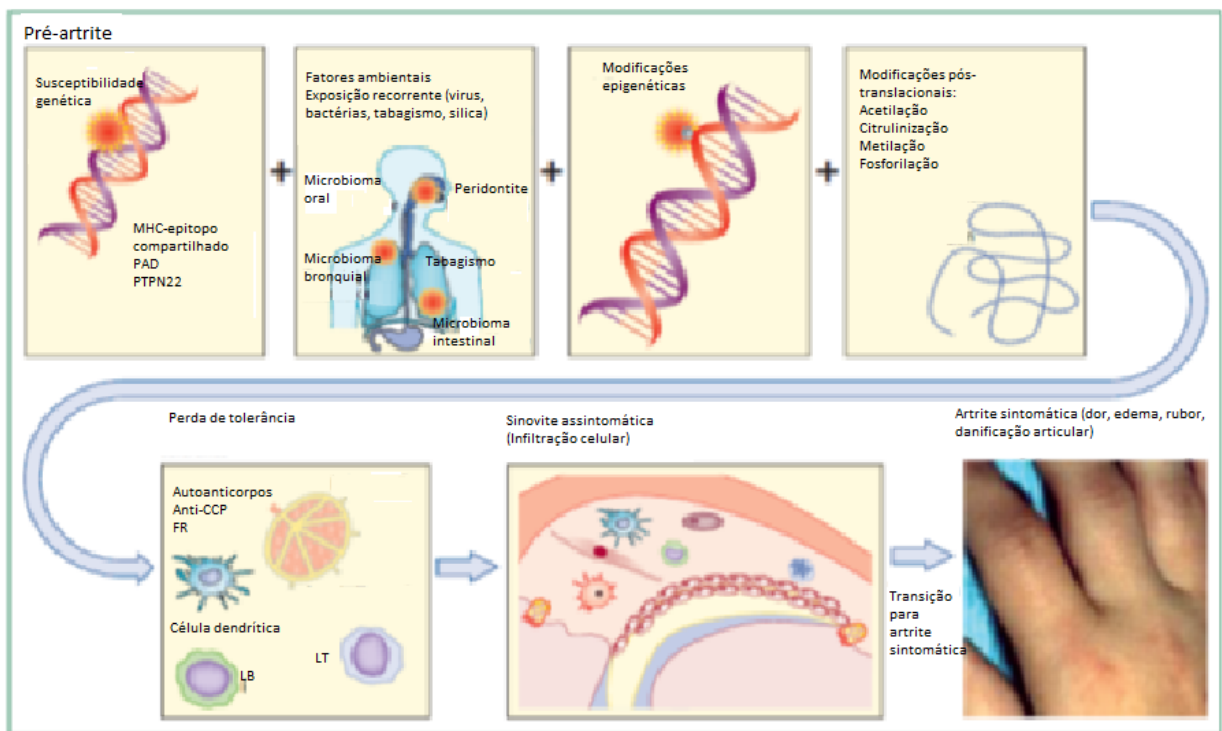
A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune associada à incapacitação progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e significativo impacto socioeconômico. A autoimunidade é caracterizada pela produção em larga escala de autoanticorpos dirigidos à fração cristalizável (Fc) da imunoglobulina (Ig) G, conhecidos como fator reumatoide (FR) e anticorpos antipeptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) (MCINNES; SCHETT, 2011). A citrulinização é um fator crítico para o reconhecimento imune de diversas proteínas (fibrina, vimentina, fibronectina, colágeno tipo II), altamente expressas na membrana sinovial durante o processo inflamatório (CHIMENTI et al, 2015).

A etiologia da AR não é completamente conhecida, mas estudos indicam o envolvimento da exposição a certos fatores ambientais em indivíduos geneticamente predispostos. Os efeitos de fatores genéticos e ambientais são reconhecidos como de grande importância na patogênese e desenvolvimento da AR (ANGELOTTI et al, 2017). A incidência estimada de AR está entre 0,5 a 1%, sendo que fatores hereditários estão envolvidos em cerca de 40-65% dos pacientes que apresentam autoanticorpos e em cerca de 20% dos que não apresentam (SMOLEN, ALETAHA e MCINNES, 2016).

Mais de 80% dos indivíduos afetados apresentam o epítipo do antígeno leucocitário humano (HLA)-DBR1\*04 (SMOLEN et al., 2007), sendo que pacientes que possuem dois desses alelos possuem elevado risco de desenvolver a doença nodular e necessidade de intervenção cirúrgica relacionada a destruição articular (WEYAND et al., 1992). O epítipo compartilhado (EC) é uma sequência de aminoácidos comuns nas posições 70-74 do HLA-DBR1, e tem uma associação reconhecida com a produção de autoanticorpos anti-CCP. Além disso, o EC é um fator de risco para destruição óssea severa (HUIZINGA et al., 2005). O fator de risco ambiental para AR melhor estabelecido é o tabagismo, porém os mecanismos exatos pelos quais essa prática favorece o desenvolvimento de AR permanecem desconhecidos. Os componentes inalados podem induzir a citrulinização de peptídeos, o que levaria à formação de autoanticorpos (KLARESKOG et al., 2006). Agentes infecciosos (vírus *Epstein-Barr*, Citomegalovírus, *Proteus* e *Escherichia coli*) e seus produtos têm sido relacionados ao desenvolvimento de AR, provavelmente devido a mecanismo de mimetismo molecular. A formação de imunocomplexos durante o curso dessas infecções poderiam ocasionar a indução da produção do FR, um autoanticorpo dirigido à porção Fc das Ig. O FR é um biomarcador para

AR que tem sido implicado em sua patogênese (MCINNES; SCHETT 2011), auxiliando tanto no diagnóstico como no prognóstico da doença.

Dessa forma a combinação da predisposição genética, fatores ambientais e modificações epigenéticas pode desencadear a perda da tolerância imunológica, favorecendo a produção de autoanticorpos, aparecimento de sinovite assintomática até a evolução para a artrite sintomática (Figura 1) (SMOLEN, ALETAHA e MCINNES, 2016).



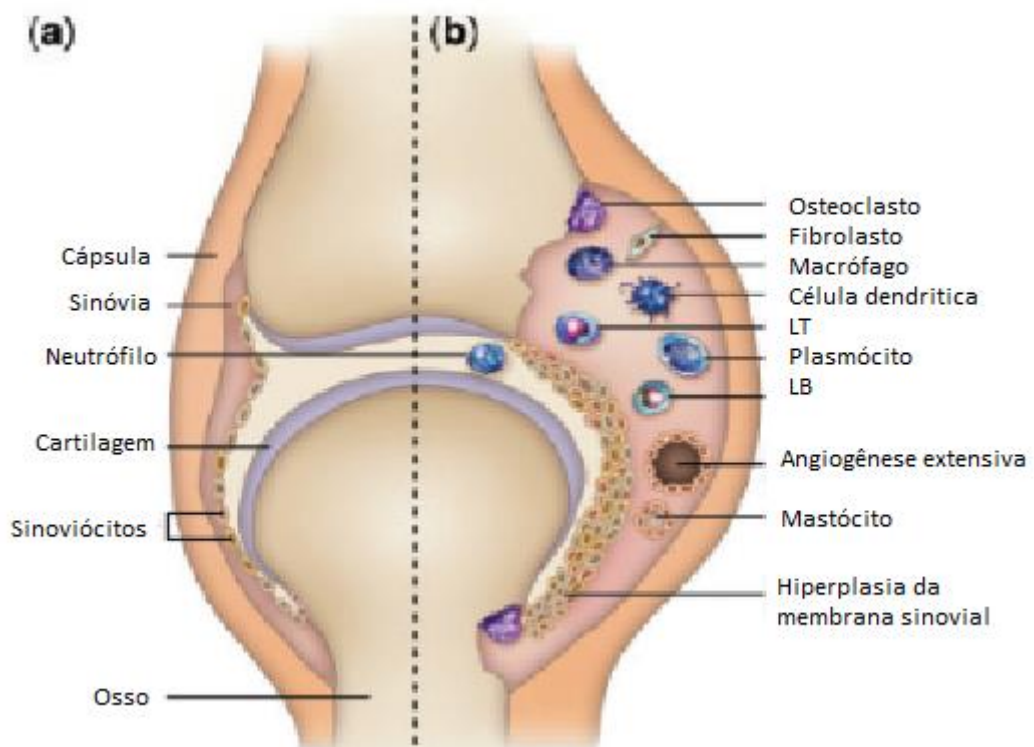
**FIGURA 1.** FATORES ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE. ADAPTADO DE: SMOLEN, ET AL (2016).

O edema articular na AR reflete a inflamação na membrana sinovial consequente da ativação imune, e é caracterizado por infiltração leucocitária. O processo inflamatório é regulado por uma complexa rede de citocinas e quimiocinas, sendo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6) essenciais para esse processo. O fator estimulador de colônias de granulócitos também pode estar envolvido na inflamação (SMOLEN, ALETAHA e MCINNES, 2016).

A membrana sinovial é um tecido conjuntivo formado por duas camadas principais. Em pacientes com AR, ocorre hiperplasia celular decorrente da infiltração de células inflamatórias que se proliferam de forma invasiva. A hiperplasia sinovial, chamada de *pannus*, consiste em um aumento na espessura da membrana superior ocasionada por proliferação celular, recrutamento de células da circulação sanguínea, redução na apoptose celular e aumento da

demanda de oxigênio com consequente hipóxia. O estado de hipo oxigenação estimula o processo de angiogênese, que é característico nas articulações de pacientes com AR (MIHALY et al., 2014).

A inflamação persistente culmina na destruição óssea e da cartilagem por diversos mecanismos (CHOY, 2012;) (Figura 2). Os neutrófilos recrutados degranulam e liberam uma variedade de enzimas e peptídeos com potencial lesivo e também podem gerar diversos radicais livres, como ânions superóxido e radical hidroxila.



**FIGURA 2:** ARTICULAÇÃO NORMAL (A) E ARTICULAÇÃO AFETADA POR AR (B): HIPERCELULARIDADE E DESTRUÇÃO ARTICULAR. ADAPTADO DE: CHOY, 2012.

As manifestações extra-articulares da AR são decorrentes do estado inflamatório sistêmico e podem incluir os sistemas cardiovascular, respiratório e hematológico. Pacientes com AR apresentam maior risco para doenças cardiovasculares em relação à população em geral, o que não pode ser explicado pelos fatores de risco tradicionais. (TANTAYAKOM et al., 2016).

O diagnóstico é baseado em manifestações clínicas e em exames laboratoriais. Quando a AR não está presente na forma clássica, o diagnóstico torna-se um desafio. Atualmente o

diagnóstico de AR é baseado em critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) em 2010, que compreende: número e tipo de articulações afetadas, presença do FR e/ou anti-CCP, proteínas de fase aguda - velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína c reativa (PCR) e duração dos sintomas. É atribuído um escore para cada item, e caso a somatória resulte em um número maior ou igual a seis, indica presença de AR (Tabela 1). (ALETAKHA et al., 2010).

**TABELA 1 – CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO COLÉGIO AMERICANO DE REUMATOLOGIA E PELA LIGA EUROPEIA CONTRA O REUMATISMO 2010 PARA ARTRITE REUMATOIDE.**

<b>Envolvimento articular</b>	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações	2
4-10 pequenas 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 normal	1
<b>Duração dos sintomas</b>	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

Artrite Reumatoide definida: ≥ 6 pontos; VHS, velocidade de hemossedimentação; PCR, proteína C reativa; FR, fator reumatoide; AACP, anticorpos anti proteína/peptídeos citrulinados. Adaptada de Colégio Americano de Reumatologia (ACR) / Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) de 2010.

Um dos índices utilizado para monitoramento da atividade da AR é o *disease activity score* (DAS). Ele foi proposto em 1990, sendo constituído pela avaliação articular de acordo com Ritchie Articular Index, uma escala visual de saúde global do paciente e a VHS (DAVIS

et al, 1990; VAN DER HEIJDE et al,1990). Em 1995 foi sugerida uma alteração na forma de avaliação, reduzindo-se o número de articulações avaliadas para 28 (DAS28). O DAS28 apresentou a mesma eficácia na avaliação da atividade da doença que o DAS original, sendo que a avaliação articular seria mais prática. Foi definido que uma pontuação inferior a 2,6 indicava remissão da doença, entre 2,6 a 3,2 como atividade baixa, acima de 3,2 e abaixo de 5,1 como atividade moderada e acima de 5,1 como grande atividade (Tabela 2). (PREVOO et al., 1995).

**TABELA 2. ÍNDICE DA ATIVIDADE DA AR PELO *DISEASE ACTIVITY SCORE 28 - VHS*.**

Pontuação	Atividade da doença
< 2,6	Remissão da doença
2,6 a 3,2	Atividade leve
> 3,2 a 5,1	Atividade moderada
> 5,1	Atividade alta

Fransen e colaboradores (2004), ao perceberem que o VHS sofre variações de acordo com a idade, sexo, etnia e níveis de proteínas plasmáticas, sugeriram a substituição deste pelo PCR como parâmetro laboratorial no cálculo do DAS28, uma vez que a PCR representaria melhor as alterações inflamatórias em curto prazo.

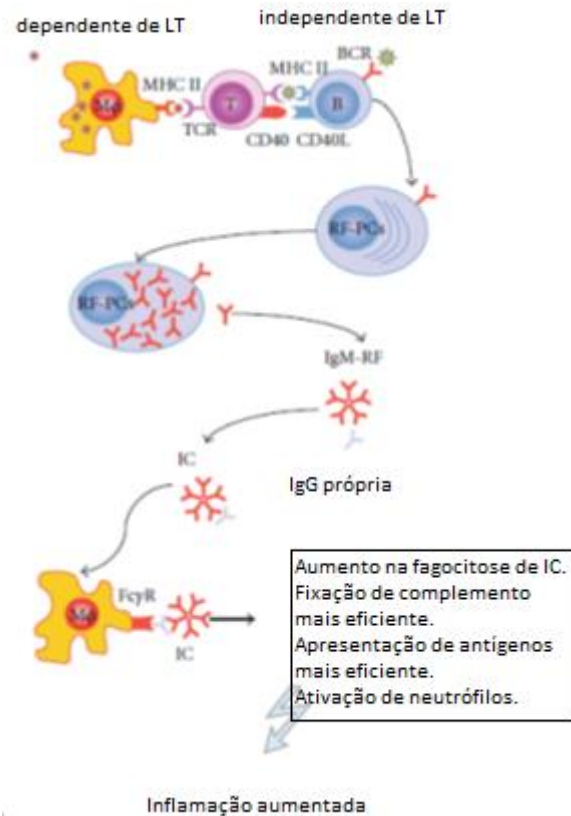
Inoue et al (2007) verificaram através das curvas ROC que o DAS28-PCR pode subestimar a atividade da doença, principalmente em escores mais baixos, demonstrar que o DAS28-VHS e o DAS28-PCR apresentaram um coeficiente de correlação de 0,946. Isso sugere cautela ao se utilizar o DAS28-PCR para determinar o manejo terapêutico da AR. Um estudo em 2015 que compara a utilização do VHS com o PCR no DAS28, mostrou que os níveis do

DAS28-VHS foram significativamente maiores que os do DAS28-PCR, confirmando a hipótese de que a PCR pode subestimar a atividade da doença (MEDEIROS et al., 2015).

## **1.2. Fator Reumatoide e Artrite Reumatoide**

O FR é uma classe de Ig que apresenta diferentes isotipos e afinidades e foi descrita pela primeira vez há mais de 70 anos. Waaler e colaboradores (1940) descreveram um anticorpo dirigido à gamaglobulina que promovia aglutinação de hemácias de carneiro sensibilizadas com doses subaglutinantes de anticorpos de coelho. Embora o seu nome se deva ao fato de terem sido primeiramente detectados em seres humanos portadores de AR, esse anticorpo também é encontrado em outras doenças autoimunes – como Lúpus Eritematoso Sistêmico, polimiosites, Síndrome de Sjogren – e, em alguns casos, em indivíduos saudáveis (INGEGNOLI; CASTELLI; GUALTIEROTTI, 2013).

Diversas hipóteses foram formuladas para explicar a possível associação do FR à AR, incluindo sua capacidade de aumentar a eliminação de imunocomplexos por macrófagos, o aumento na citotoxicidade à anticorpos antivirais, e o aumento na eliminação de parasitas. Também foi sugerido que o FR potencializa a apresentação de antígenos aos linfócitos T (LT) por meio de células da captura de imunocomplexos com antígenos estranhos por células dendríticas ou por meio de linfócitos B (LB) produtores de FR, que parecem ser apresentadoras de antígenos mais eficientes que outros LB. A definição de FR como anti-IgG ou anti-gamaglobulina é imprecisa, uma vez que restringe a afinidade do FR para a fração Fc de IgG, sendo que também pode, embora com menor frequência, ser dirigidos a IgA, IgE e IgM (Figura 3) (INGEGNOLI; CASTELLI; GUALTIEROTTI, 2013).



**FIGURA 3.** O PAPEL IMUNOLÓGICO DO FATOR REUMATOIDE NA ARTRITE REUMATOIDE. ADAPTADO DE: INGEGNOLI, ET AL (2013).

A melhor combinação sorológica para triagem de AR é a utilização em conjunto do anti-CCP, FR IgM e FR IgA, garantindo uma maior sensibilidade (BLOCK et al, 2012; INFANTINO et al, 2014). Embora o FR possa ser detectado em pacientes com outras doenças do tecido conjuntivo, o isotipo do FR é útil no manejo de pacientes com AR, do diagnóstico à decisão terapêutica. A detecção do FR em pacientes com AR apresenta uma sensibilidade de 60-90% e uma especificidade de 85% (INGEGNOLI; CASTELLI; GUALTIEROTTI, 2013).

Uma meta-análise demonstrou que o FR foi capaz de prever a resposta clínica ao tratamento com rituximab e tocilizumab, mas não para o abatacept (MANEIRO et al., 2013). Já Salgado (2014) reportou em uma meta-análise que o FR não se relacionou com a resposta a antagonistas do TNF- $\alpha$ .

O critério diagnóstico de AR mais recente foi descrito em 2010, contendo como marcadores sorológicos o FR e o anti-CCP. Embora o FR apresente baixa especificidade, tem sido bastante utilizado para o diagnóstico da AR por um longo tempo, uma vez que não haviam

alternativas melhores. A descoberta do anti-CCP mudou esse quadro, pois apresenta maior sensibilidade e especificidade que o FR (VERHEUL et al., 2015).

### 1.3 Anti-CCP e AR

Os autoanticorpos anti-CCP são fortemente associados a AR, sugerindo um importante papel na patogênese da doença. A maioria dos pacientes com AR apresenta positividade para o anti-CCP anos antes do surgimento de qualquer manifestação clínica, embora inicialmente sejam produzidos em baixos títulos. À medida que o indivíduo se aproxima do surgimento de sintomas, a concentração desses autoanticorpos tende a se elevar. Os títulos desses autoanticorpos podem chegar a 30 µg/ml no soro de pacientes com alta atividade da doença, sendo que essa concentração seria equivalente a aproximadamente uma molécula de anti-CCP IgG para cada 1.000 moléculas de IgG presentes (WILLEMZE et al., 2012).

Os autoanticorpos anti-CCP reconhecem peptídeos que sofreram processo de citrulinização, gerando neoantígenos que podem ativar os linfócitos T (LT), que por sua vez estimulam os linfócitos B (LB) a produzirem esses autoanticorpos. A citrulinização é uma modificação pós-translacional de proteínas, na qual resíduos de arginina são convertidos a citrulina pela ação da enzima peptidilarginina desiminase (SAKKAS et al., 2017).

O gene HLA-DRB1SE tem sido associado como fator de risco independente para o desenvolvimento de AR, mas existem evidências de que também esteja envolvido na produção de anti-CCP (SAKKAS et al., 2017). Pacientes com AR que apresentam positividade para o anti-CCP tendem a apresentar diferenças na fase sintomática que precede o desenvolvimento da AR, com progressão mais rápida e maiores alterações na atividade da doença. Somando-se a isso, diversos estudos indicaram uma capacidade prognóstica do anti-CCP, sendo possível prever a progressão radiológica por esse biomarcador (ZENDMAN; van VENROOIJ; PRUJIN, 2006). A presença concomitante de anti-CCP e FR se relaciona a maior comprometimento articular e maior quantidade de erosões articulares (ORR et al., 2017; OLIVIER et al., 2017). O anti-CCP apresenta uma associação sinérgica com o FR mediando o processo inflamatório e a atividade da doença (SOKOLOVE et al., 2014), sendo que pacientes com AR que apresentam o anti-CCP necessitam de uma combinação de drogas modificadoras do curso da doença (DMARD) com corticosteroides para prevenir a progressão radiológica, enquanto pacientes com anti-CCP ausente apresentam progressão radiológica mínima, independentemente do tratamento utilizado (SEEGOBIN et al., 2014).

Os autoanticorpos anti-CCP também podem ser usados para distinguir pacientes com AR de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) que apresentem poliartrite erosiva, sendo frequentemente acompanhada de positividade para o FR. Pacientes soropositivos para o vírus da hepatite C (VHC) também podem apresentar positividade para o FR, especialmente quando apresentam envolvimento articular, mas nesses casos não se observa a presença do anti-CCP. Outras doenças similares a AR podem apresentar positividade para o anti-CCP, como a síndrome de Sjögren e a artrite psoriática, mas a prevalência é baixa, estando em torno de 8% dos casos (ZENDMAN; van VENROOIJ; PRUIJIN, 2006).

A descoberta dos autoanticorpos anti-CCP representou um avanço no diagnóstico, tendo em vista que aproximadamente dois terços dos pacientes com AR produzem esses anticorpos (PRUIJIN, WIJK, VENROOIJ, 2010).

#### **1.4 Envolvimento de Fator de Necrose Tumoral na fisiopatologia da AR**

Aproximadamente há três décadas, foram identificados produtos oriundos de linfócitos e macrófagos que causavam a lise celular. Esses produtos foram chamados de linfotoxinas (LTA) e fator de necrose tumoral (TNF), respectivamente. Desde então, se tornou evidente que a LTA e o TNF pertencem a uma grande família de proteínas estruturalmente relacionadas (GOETZ et al., 2004).

O TNF- $\alpha$  é produzido por células fagocíticas, células *natural killers* (NK), linfócitos B, linfócitos T ativados, fibroblastos sinoviais, mastócitos, células endoteliais e osteoblastos (GREMESE; FERRACCIOLI; 2011). A produção de TNF- $\alpha$  está associada à resposta Th1, indução da ativação de uma grande variedade de células e expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas apontando para um papel inflamatório do TNF- $\alpha$ . Uma das principais propriedades do TNF- $\alpha$  é a ação pró-apoptótica, que afeta o crescimento, diferenciação e fisiologia de uma variedade de tipos celulares. Esta citocina possui efeito pleiotrópico, importante na resposta imune, com envolvimento no metabolismo lipídico, catabolismo proteico e influencia a atividade de diversas doenças, como câncer, AIDS e resistência à insulina relacionada à obesidade (GOETZ et al., 2004). Dessa forma, também são induzidas a produção excessiva de outras citocinas, como a interleucina 6, que por sua vez também colabora para o processo inflamatório persistente e destruição articular (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

O Fator de Necrose Tumoral beta (TNF- $\beta$ ), também denominado de Linfotoxina alfa (LTA), é uma proteína produzida por células Th1 que induz as células endoteliais a alterar suas

moléculas de adesão para permitir a ligação das células fagocíticas para a transmigração endotelial. Ambas as citocinas, TNF e LTA, desempenham papel importante na fisiopatologia de diversas doenças autoimunes (PARHAM, 2005). Ambas as citocinas são reconhecidas pelos mesmos receptores celulares de TNF, como o TNFR1 e o TNFR2, e como consequência muitos dos seus efeitos são similares (CROFT; SIEGEL, 2017).

A distinção mais importante entre o TNF- $\alpha$  e o TNF- $\beta$  parece ser que o TNF- $\beta$  é sintetizado exclusivamente pelos LT, enquanto que o TNF- $\alpha$ , embora produzido por LT, é predominantemente derivado de fagócitos mononucleares. As quantidades de TNF- $\beta$  sintetizada pelos LT se apresentam em menores quantidades em relação as quantidades de TNF- $\alpha$  produzidas pelos fagócitos mononucleares, por isso TNF- $\beta$  não é prontamente detectado na circulação. O TNF- $\beta$  também é um ativador das células endoteliais vasculares, causando aumento da adesão leucocitária, produção de citocinas e alterações morfológicas que facilitam o extravasamento leucocitário (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

A produção excessiva de TNF- $\alpha$  tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias, como AR, psoríase e espondilite anquilosante. Entre as propriedades inflamatórias do TNF- $\alpha$  estão a ativação endotelial, coordenação do recrutamento de células do sistema imune para os tecidos inflamados e promoção da destruição tecidual. (GREMESE; FERRACCIOLI, 2011; MERONI; VALESINI, 2014; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2015).

Um fator chave no processo inflamatória da AR é a produção excessiva de TNF- $\alpha$ , que é responsável por induzir a inflamação sinovial. A produção excessiva de TNF- $\alpha$  tem várias causas, incluindo interações entre LT e LB, fibroblastos sinoviais e macrófagos (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Sua principal função na patogênese da AR é aumentar a ativação dos monócitos e liberação de citocinas e prostaglandinas (MERONI; VALESINI, 2014). Diversos estudos demonstraram que essa citocina apresenta um importante papel na destruição articular local e na perda de massa óssea sistêmica, uma vez que pode induzir a reabsorção óssea mediada por osteoclastos (MANARA; SINIGAGLIA, 2015).

Em alguns estudos em pacientes com AR, o tratamento prolongado com anti-TNF foi capaz de promover a sensibilidade à insulina, sugerindo que o TNF- $\alpha$  está envolvido na resistência à insulina observada nesses indivíduos. O TNF- $\alpha$  apresenta papel central na disfunção endotelial, e há evidências de que o bloqueio da atividade do TNF- $\alpha$  em indivíduos com AR reduza essa disfunção (GREMESE; FERRACCIOLI, 2011). Dentre os agentes biológicos utilizados para o tratamento da AR estabelecida, os medicamentos inibidores do TNF são normalmente utilizados de forma contínua, a não ser que seja observado que tenham

se tornado ineficazes ou o paciente desenvolva algum efeito adverso importante (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

### **1.5 Polimorfismo do fator de necrose tumoral- $\beta$ (TNF- $\beta$ )**

Uma variedade de mutações pode ocorrer no DNA, algumas das quais levam a uma mudança na função ou produção do produto gênico. A mudança mais simples e mais frequente que pode ocorrer é a substituição de um nucleotídeo por outro, conhecida como polimorfismo de único nucleotídeo ou *single-nucleotide polymorphism* (SNP) (WATERER et al., 2001). O polimorfismo genético é definido como a presença de um alelo variante que existe de forma estável na população em uma frequência (geralmente maior que 1%). É interessante notar que a presença dos SNPs dentro de regiões codificadoras que alteram aminoácidos ocorre com uma frequência muito baixa, SNPs dentro de regiões codificadoras que não alteram a sequência de aminoácidos ocorrem um pouco mais frequentemente. Já os SNPs dentro de regiões promotoras ocorrem bem mais frequentemente e finalmente aqueles SNPs dentro de regiões não codificadoras são os mais frequentemente observados (HOLMES; RUSSELL; WALLWEY, 2003).

O *TNF- $\beta$*  é homólogo ao *TNF- $\alpha$*  com apenas 1.240 bases separando o sítio de transcrição do *TNF- $\beta$*  do início do sítio de transcrição do *TNF- $\alpha$*  (POSH et al., 2003). O gene *TNF- $\alpha$*  possui quatro exóons e três introns. O gene *TNF- $\beta$*  é similar, pelo fato que as sequências codificadoras são arranjadas entre três exóons primários (GOETZ et al., 2004). Segundo a literatura (MESSER et al., 1991; STUBER et al., 1996; MAJETSCHAK et al., 1999), o polimorfismo TNF- $\beta$  estaria localizado em uma região intrônica não codificadora do gene da citocina TNF- $\beta$  e estaria associado ao aumento nos níveis séricos do TNF- $\alpha$  em pacientes com sepse grave, indicando que poderia ser um marcador genético da resposta de TNF- $\alpha$  e pior prognóstico nesses pacientes.

Estudos demonstraram que o polimorfismo genético do *TNF- $\beta$*  é especialmente interessante uma vez que variações nessa região são responsáveis pela regulação transcricional e podem ter implicações para a expressão do gene *TNF- $\alpha$*  e variação na síntese do TNF- $\alpha$  (MESSER et al., 1991; HUIZINGA et al., 1997; MAJETSCHAK et al., 2002; SHARMA et al., 2006; KALLAUR et al., 2014). As diferenças individuais na produção do TNF- $\alpha$  podem ser devido as diferenças na velocidade de transcrição, a regulação na estabilidade do RNA mensageiro, efetividade translacional ou processamento final da proteína (HUIZINGA et al., 1997).

O gene do *TNF- $\alpha$*  está localizado no cromossomo 6, entre os genes *HLA-B* e o *HLA-DR*, e polimorfismos no *TNF- $\alpha$*  e no *TNF- $\beta$*  são descritos regulando suas produções. O polimorfismo *TNF- $\beta$*  +252 G>A que ocorre na posição +252 dentro do primeiro intron do *TNF- $\beta$* , em que uma guanina caracteriza o alelo B1 e uma adenina caracteriza o alelo B2, foi associado com maiores produções do TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ . O alelo B1 tem se apresentado menos frequente que o alelo B2 em diversas populações. Inicialmente, foi denominado como polimorfismo +252 G>A e, atualmente, é identificado como rs909253 (MESSER et al., 1991; LU et al., 2005; SANTOS et al., 2011; KALLAUR et al., 2014; EL-TAHAN et al., 2016; UMARE et al., 2017).

O polimorfismo *TNF- $\beta$*  +252 G>A tem sido associado a um maior risco de desenvolvimento de diversas doenças autoimunes, como a trombocitopenia imune primária (YADAV et al., 2016), lúpus eritematoso sistêmico (LES) (PARKS et al., 2004; UMARE et al., 2017), esclerose múltipla (KALLAUR et al., 2014), vitiligo (LADDHA et al., 2013), esclerodermia (PANDEY; TAKEUCHI, 1999) e síndrome de Sjögren primária (BOLSTAD et al., 2013). O papel desse polimorfismo na susceptibilidade da AR ainda não está bem definido e poucos estudos avaliam sua associação com os níveis de TNF- $\alpha$  (VANDERVYVER et al., 1994; VINASCO et al., 1997; TAKEUCHI et al., 2005; KARRAY et al., 2011; SAAD et al., 2015) ou com a produção de autoanticorpos (PANOULAS et al., 2008; AL-RAYES et al., 2011). O genótipo TNF B2/B2 foi associado com aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e redução nos níveis de IL-4 e IL-10 em pacientes com esclerose múltipla, sugerindo que esse genótipo é acompanhado por aumento no potencial inflamatório e diminuição da resposta anti-inflamatória em comparação a outros genótipos (KALLAUR, 2014).

Estudos conduzidos na Bélgica (VINASCO et al., 1997) e Espanha (VINASCO et al., 1997) não encontraram associação entre o *TNF- $\beta$*  +252 G>A e a susceptibilidade à AR. Zhang e colaboradores (2015) também demonstraram em uma meta-análise que esse polimorfismo não está significativamente associado a AR utilizando diversos modelos em caucasianos e não caucasianos. Por outro lado, o alelo B2 foi associado a uma maior susceptibilidade a AR em estudos conduzidos em Portugal, Japão e Egito. (VINASCO et al., 1997; TAKEUCHI et al., 2005; SAAD et al., 2015). Essas discrepâncias podem ser explicadas pelas diferenças nos tamanhos amostrais e diferenças genéticas entre essas populações.

Outros estudos demonstraram que o genótipo B1/B1 está associado a níveis elevados de PCR, mas não com os níveis de TNF- $\alpha$  ou IL-6 em pacientes com AR (SANTOS et al., 2011). Em um estudo realizado no Egito, pacientes com AR e o genótipo B1/B1 apresentaram maiores níveis de TNF- $\alpha$  em comparação à pacientes com o genótipo B2/B2, porém o tamanho amostral

foi pequeno e as frequências genóticas não estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg (SHAKER et al., 2016). Apenas dois estudos avaliaram a associação do polimorfismo *TNF-β* +252 G>A com o FR e o anti-CCP em pacientes com AR, e descreveram que o alelo B1 ou o genótipo B1/B1 não estavam associados com esses anticorpos (AL-RAYES et al., 2011; PANOULAS et al., 2008).

## 2.0 JUSTIFICATIVA

A AR é uma doença que leva a incapacitação progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e significativo impacto socioeconômico. Vários polimorfismos genéticos descritos nas diferentes populações mundiais têm sido associados com doenças autoimunes. Poucos estudos avaliaram a frequência de polimorfismos genéticos como o do *TNF- $\beta$*  +252 G>A e sua associação com a AR, a produção de TNF- $\alpha$ , a evolução da doença, a incapacidade, e resposta a tratamentos imunomoduladores e imunossupressão. Além disso os estudos existentes apresentam resultados contraditórios.

Compreender a fisiopatologia da AR pode levar a identificar biomarcadores que possam prever a atividade e progressão da doença. A identificação de novos biomarcadores poderia ser utilizada para melhorar o monitoramento dos pacientes com AR e a conduta médica, possibilitando o aperfeiçoamento dos protocolos de atendimento de acordo com o perfil genético do paciente.

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação entre o polimorfismo do *TNF-β* +252 G>A (rs909253) com a susceptibilidade à AR, os níveis séricos de TNF- $\alpha$  e a presença de autoanticorpos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência do polimorfismo genético do *TNF-β* +252 G>A em pacientes com AR e em indivíduos controle;
- Verificar se o polimorfismo genético do *TNF-β* +252 G>A está associado à presença de AR e a alteração dos níveis de TNF- $\alpha$  e de seus receptores (sTNFR1 e sTNFR2);
- Verificar se há associação entre a positividade de autoanticorpos FR e/ou anti-CCP e a presença do polimorfismo do *TNF-β* +252 G>A, e se esta associação pode alterar os níveis de TNF- $\alpha$  em pacientes com AR;
- Determinar quais parâmetros clínicos, antropométricos e laboratoriais podem prever as alterações nos níveis de TNF- $\alpha$  em pacientes com AR de acordo com o genótipo e a presença de FR e/ou anti-CCP;
- Avaliar a associação entre o polimorfismo genético do *TNF-β* +252 G>A com a atividade da doença avaliada pelo DAS28-VHS e DAS28-PCR.

## 4.0 SUJEITOS E MÉTODOS

### 4.1. Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE. 06405812.1.0000.5231), Parecer CEP/UEL nº 205.175, Anexo A). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (Apêndice A). Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas na Declaração de Helsinque.

### 4.2. Delineamento do estudo

Participaram deste estudo caso-controle 558 indivíduos de ambos os sexos, sendo 261 pacientes com AR, selecionados do Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina e 297 indivíduos controles selecionados entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina. Os indivíduos controles não estavam recebendo dieta específica, não estavam em tratamento com anti-inflamatórios ou antibióticos, e não apresentavam doenças cardíacas, tireoidianas, renais, hepáticas, gastrointestinais, oncológicas ou outras doenças autoimunes. Informações referentes a estilo de vida e histórico médico foram obtidas a partir de avaliação clínica de cada paciente (Apêndice B)

O diagnóstico do AR foi realizado a partir dos critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia e da Liga Europeia Contra o Reumatismo, de 2010 (ALETAHA et al., 2010) e a atividade da doença foi determinada pelos escores DAS28-PCR e DAS28-VHS (PREVOO et al., 1995).

Inicialmente, pacientes com AR e controles foram divididos em dois grupos de acordo com a presença da doença. Foi realizada comparação entre os resultados desses grupos para diversos parâmetros clínicos e laboratoriais, incluindo a comparação na distribuição do polimorfismo *TNF-β* +252 G>A. Posteriormente, foi realizado um novo delineamento no qual os pacientes com AR foram alocados em dois grupos de acordo com o polimorfismo *TNF-β* +252 G>A e comparados os diversos parâmetros clínicos e laboratoriais.

### **4.3. Medidas Antropométricas**

O peso corporal foi avaliado com aproximação de 0,1 kg utilizando uma balança eletrônica e com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da manhã, a altura foi medida com precisão de 0,1 cm, utilizando-se um estadiômetro. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado.

### **4.4. Exames Laboratoriais**

#### **4.4.1. Coleta de sangue**

Amostras de sangue periférico dos indivíduos envolvidos na pesquisa foram obtidas de acordo com protocolo de Teunissen e colaboradores (2011). As amostras foram coletadas com o sistema de coleta a vácuo em tubos com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante e em tubos sem anticoagulante após 12 horas de jejum. Após a coleta, as amostras foram identificadas com números sequenciais para garantir a confidencialidade e o material foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Plasma, soro e *buffy-coat* foram aliquotados em tubos tipo *ependorf* e armazenados em *freezer* -80°C para posterior análise.

#### **4.4.2. Marcadores Imunológicos e Inflamatórios**

Os níveis de anticorpos anti-CCP e ferritina foram determinados por quimioluminescência em micropartículas (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os níveis de FR e PCR ultrasensível foram determinados por imunoturbidimetria (c8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). A velocidade de hemossedimentação foi determinada por método automatizado (Alipax).

#### **4.4.3 TNF- $\alpha$ e os receptores sTNFR1 e sTNFR2**

Os níveis de TNF- $\alpha$  e dos receptores sTNFR1 e sTNFR2 foram determinados pelo kit customizado para detecção destes três componentes (Novex Life Technologies, Frederick, United States of America) para plataforma Luminex®. Pacientes tratados com inibidor de TNF foram excluídos das análises de TNF- $\alpha$  e seus receptores.

#### 4.4.4 Polimorfismo genético NcoI do TNF- $\beta$

O ácido desoxiribonucleico (DNA) genômico foi extraído com o kit de extração de DNA com coluna de resina (Biopur Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Paraná, Brasil) de acordo com instruções do fabricante, com algumas modificações, como o volume de *buffy-coat* utilizado (200 $\mu$ L) e a temperatura do tampão de eluição (70°C). A presença e integridade do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado na presença de luz ultravioleta (UV), comparando a um DNA padrão.

Um fragmento de 782 pares de base (pb) do gene *TNF- $\beta$*  foi amplificado utilizando a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) de acordo com dados descritos na literatura (MAJETSCHAK, et al., 1999; MAJETSCHAK et al., 2002; DELONGUI, et al., 2011) com algumas modificações. Os *primers* foram desenhados de acordo com *GenBank* número X02911 (MAJETSCHAK et al., 1999). O *Primer 1* (*TNFB1 sense*) é formado pela sequência 5' CCG TGC TTC GTG CTT TGG GAC TA 3' e o *Primer 2* (*TNFB2 antisense*) é formado pela sequência 5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 $\mu$ L contendo 1,5 $\mu$ L de cada *primer* 2,5 mM, 0,75 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50 mM de 2 $\mu$ L de dNTP 1,25 mM (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0,25 $\mu$ L da enzima DNA polimerase recombinante 1,25 U diluída em 2,5 $\mu$ L de tampão da enzima (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2,0 $\mu$ L da amostra de DNA com 50-100 ng. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PCR Sprint-Thermo Hybaid® (Biosystems, Barcelona, Espanha), com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; seguido por 37 ciclos de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 67°C para o anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão, com posterior 10 minutos a 72°C para a extensão final. Um controle negativo (sem amostra de DNA) e um positivo (com DNA) foi incluído em cada bateria de PCR. O produto de amplificação foi avaliado pela eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando um marcador de 100 pb (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), corado com brometo de etídio e visualizado em presença de luz UV com o sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil).

Dez microlitros do produto de PCR foram completamente digeridos com 0,2 $\mu$ L de enzima de restrição recombinante *NcoI* 10 U/ $\mu$ L (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com incubação em banho-maria a 37°C por 4 horas. Os fragmentos da digestão enzimática foram analisados pelo método de polimorfismo do comprimento do fragmento de

restrição (RFLP) em eletroforese com gel de agarose 3% (70V, 70 minutos), seguida de coloração com brometo de etídio (MAJETSCHAK, et al., 1999; MAJETSCHAK et al., 2002; DELONGUI, et al., 2011). O alelo G (TNFB1) inclui o sítio de restrição da enzima *NcoI* e apresenta um fragmento de 196 pb e outro de 586 pb o alelo A (TNFB2) com ausência do sítio de restrição apresenta um único fragmento de 782 pb. Com isto, 3 genótipos são determinados: GG (TNFB1/B1, fragmentos 586 pb e 196 pb), GA (TNFB1/TNFB2, com fragmentos 782 pb, 586 pb e 196 pb) e AA (TNFB2/B2, com fragmento 782 pb). As imagens foram capturadas e armazenadas pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil).

#### 4.5 Análise estatística

Foram realizadas análises de tabelas de contingência (teste  $\chi^2$ ) para verificar associações entre variáveis categóricas e o grupo diagnóstico. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar se dos dados apresentavam distribuição normal. Quando os dados contínuos não apresentaram distribuição normal ou quando apresentavam heterogeneidade de variância (verificada pelo teste de Levene) foram transformados em logaritmo natural (Ln). As diferenças entre os grupos para as variáveis contínuas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVAs). As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%) e as variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  erro padrão da média (EPD). Foi avaliada a associação entre os biomarcadores inflamatórios e a AR por regressão logística binária controlando para covariáveis que poderiam confundir a associação de interesse. Regressão logística binária (*automatic stepwise*) foi empregada para delinear as variáveis mais significativamente associadas com a positividade para o FR e para o anti-CCP. Para delinear os preditores dos níveis de TNF- $\alpha$ , realizamos três diferentes regressões lineares (*stepwise*) de acordo com o polimorfismo para o *TNF- $\beta$  +252 G>A* e a presença de autoanticorpos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa IBM SPSS Windows versão 24. Os testes foram bicaudais e um valor de alfa de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 5.0 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico intitulado:

**“TNF- $\beta$  +252 G>A (rs909253) POLYMORPHISM IS INDEPENDENTLY ASSOCIATED WITH PRESENCE OF AUTOANTIBODIES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS ”.**

Este artigo foi submetido ao periódico Cytokine (fator de impacto de 3.488)

## 6.0 ARTIGO

### **TNF- $\beta$ +252 G>A (rs909253) POLYMORPHISM IS INDEPENDENTLY ASSOCIATED WITH PRESENCE OF AUTOANTIBODIES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS**

Fabiano Aparecido de Medeiros<sup>1</sup>, Daniela Frizon Alfieri<sup>1</sup>, Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda<sup>2</sup>, Neide Tomimura Costa<sup>3</sup>, Elaine Regina Delicato de Almeida<sup>4</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>4</sup>, Naiara Lourenço Mari<sup>1</sup>, Tamires Flauzino<sup>1</sup>, Marcelo Cândido de Sá<sup>1</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>4</sup>, Isaias Dichi<sup>3</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>4</sup>

- 1 Research Laboratory in Applied Immunology– University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
- 2 Department of Rheumatology – PUC, Pontifícia Universidade Católica, Londrina, Paraná,
- 3 Department of Internal Medicine – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
- 4 Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – 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:**

The *TNF- $\beta$*  +252 G>A (rs909253) polymorphism has been associated with a risk of development of rheumatoid arthritis (RA) and could influence plasma TNF- $\alpha$  levels. The aim of the present study was to evaluate the association between the *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism with plasma TNF- $\alpha$  levels, the presence of autoantibodies, and the susceptibility for rheumatoid arthritis (RA). This cross-sectional study included 261 patients with RA and 292 controls. The polymorphism was studied using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length (RFLP). Soluble TNF- $\alpha$  and receptors were measured by multiplex assay. Rheumatoid factor (RF) and anticyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCP) were measured using immunoassay. No differences were observed in allele frequency and genotype distribution among patients and controls. The presence of RF ( $p=0.020$ ) and anti-CCP ( $p=0.001$ ) increased 4.23-fold and 8.13-fold, respectively, in patients with B1 allele (B1/B2+B1/B1 genotypes) independently of demographic, clinical and inflammatory markers. Among patients with B1/B2+B1/B1 genotypes, higher TNF- $\alpha$  levels were associated with positive RF ( $p=0.040$ ), anti-CCP ( $p=0.011$ ), or both ( $p=0.038$ ). In patients carrying B1 allele, the increased sTNFR1 together RF or anti-CCP or both explained about 39.0% the variations in TNF- $\alpha$  levels. However, in B2/B2 genotype, the presence of these autoantibodies was not associated with TNF- $\alpha$  levels. Our findings indicate that the *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism was not associated with RA susceptibility and TNF- $\alpha$  plasma levels. However, B1 allele was associated with the presence of autoantibodies. In addition, interaction between the presence of B1 allele and autoantibodies was associated with the increase of plasma TNF- $\alpha$  levels in RA patients.

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common inflammatory autoimmune diseases. It is characterized by persistent synovitis, systemic inflammation and production of autoantibodies <sup>1</sup>. Although the precise etiology of (RA) has not been established yet, it is believed that the tendency to develop RA may be genetically inherited. Also, environmental factors, such as smoking and infections, may cause the malfunction of the immune system in genetically predisposed individuals <sup>2,3</sup>. Genes within the major HLA region remain the most powerful disease risk genes in RA <sup>4</sup> and genetic variance within HLA contributes to almost 50% of the genetic susceptibility for RA <sup>5</sup>.

Both rheumatoid factor (RF) and anticyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCP) are diagnostic biomarkers in RA, and concomitant evaluation of RF and anti-CCP represents the most powerful prognostic biomarker for RA <sup>6,7</sup>. These autoantibodies have been shown to be associated with progression and joint destruction <sup>8-10</sup> and also associated with increased tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in *in vitro* <sup>11,12</sup> and *in vivo* studies <sup>13,14</sup>. TNF- $\alpha$ , which is the main mediator of inflammation in RA, is a potent proinflammatory cytokine upregulated in the joints and associated with the disease activity <sup>13,15-17</sup>.

Tumor necrosis factor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) also known as lymphotoxin A (LTA), is a close homologue of TNF- $\alpha$  <sup>18</sup>. Both cytokines are recognized by the same widely distributed cellular TNF receptors, such as TNFR1 and TNFR2, and consequently they have many similar effects <sup>16</sup>. The TNF- $\alpha$  gene is located on chromosome 6, between HLA-B and HLA-DR genes, and polymorphisms in the *TNF- $\alpha$*  and *TNF- $\beta$*  have been described to regulating its production <sup>19-21</sup>. A polymorphism at position +252 within the first intron of the *TNF- $\beta$*  (rs909253) consisting of a guanine base characterizes the B1 allele, whereas an adenine base characterizes the B2 allele. The B1 allele is less frequent than the B2 allele, and is associated with higher TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  production <sup>20-22</sup>.

The *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism has been associated with a risk of development of several autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) <sup>20,23</sup>, multiple sclerosis <sup>24</sup>, vitiligo <sup>25</sup>, scleroderma <sup>26</sup>, and primary Sjögren's syndrome <sup>27</sup>. The role of this polymorphism on the RA susceptibility is unclear <sup>28-34</sup>, and TNF- $\alpha$  levels and its association with autoantibodies has been scarcely studied <sup>28,29</sup>. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the association between the *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism with serum TNF- $\alpha$  levels, the presence of autoantibodies, and the susceptibility for RA.

## SUBJECTS AND METHODS

### *Subjects*

This cross-sectional study included 261 patients with RA, and 297 healthy individuals from the same geographic area as a control group. The patients were recruited at the Rheumatology Ambulatory of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. The patients were classified according to the rheumatoid arthritis classification criteria<sup>35</sup> Disease activity status was determined using Disease Activity Score in 28 joints based on C-reactive protein (DAS28 CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) (DAS28 ESR)<sup>36</sup>. Information about lifestyle and medical history were obtained at clinical evaluation. None of the subjects was receiving a specific diet. None of the participants in the study presented heart, renal, thyroid, hepatic, gastrointestinal, oncological or other autoimmune diseases, and none had a clinically evident infection or was receiving estrogen replacement therapy. Patients treated with TNF-inhibitors were excluded from analyzes of TNF- $\alpha$  and receptors.

### *Anthropometric measurements*

Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (cm) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian (Asiatic, Black, and Afro-Brazilian)<sup>37</sup>. This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki. The Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil approved all procedures involving human subjects. Written informed consent was obtained from all patients (CAAS: 06405812.1.0000.5231).

### *Biochemical and immunological biomarkers*

Peripheral blood samples were collected with EDTA as anti-coagulant, and without anticoagulant, to obtain the buffy coat and plasma, and serum, respectively. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer until used. White blood cell counts and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were determined using hematological autoanalyzer's. Serum levels of and CRP were determined using high-sensitivity (hsCRP) and ferritin with chemiluminescence microparticle assay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Rheumatoid factor titers were measured using a turbidimetric assay (C8000, ABBOTT, Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) and the results were expressed as U/mL. Anti-CCP were assayed using the chemiluminescence microparticle immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), and the results were expressed as U/mL.

*Plasma level of TNF- $\alpha$  and soluble TNF receptor 1 (sTNFR-1) and receptor 2 (sTNFR-2) determination*

Soluble TNF- $\alpha$ , TNFR-1 and TNFR-2 were determined by Human Magnetic 3-plex Custom kit, a TNF Superfamily Panel, that detects these three molecules at the same time (Novex Life Technologies, Frederick, United States of America) for Luminex® platform.

*TNF- $\beta$  +252 G>A genetic polymorphism*

The genomic DNA was extracted from the buffy coat using a commercial DNA extraction kit (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's instructions. A 782 base-pair (bp) fragment of the *TNF- $\beta$*  was amplified using polymerase chain reaction (PCR) as previously reported<sup>38</sup>, and the primers used were determined according to the GenBank number X02911 as follow: primer sense, 5' CCG TGC TTC GTG CTT TGG GAC TA 3' and primer antisense, 5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). PCR conditions were performed in a thermocycler (PCR Sprint- Thermo Hybaid™, Biosystems, Barcelona, Spain) that comprised 5 min denaturation at 94 °C for initial denaturation; 37 cycles of 45 s at 94°C for denaturation, 45 s at 67 °C for the annealing and 45 s at 72°C for the elongation; and 10 min at 72 °C for final elongation. PCR products were completely digested with *NcoI* enzyme (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 4 h at 37°C. The *NcoI* genotypes were identified by restriction fragment length polymorphism analysis in a 3 % agarose gel electrophoresis (70 V, 70 min) and stained with ethidium bromide. The B1 allele includes a restriction site for *NcoI* and results in 196- and 586-bp fragments after digestion, and the B2 allele (lacking the restriction site for *NcoI*) results in a fragment with 782 bp. The heterozygous genotype B1/B2 results three fragments (782, 586, and 196 bp).

*Statistics*

Analyzes of contingency tables ( $\chi^2$  test) were employed to check the associations between categorical variables and diagnostic groups. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformation of continuous data was used in the analysis when the variables were not normally distributed or when there was heterogeneity of variance (as assessed with the Levene test. We assessed the differences in continuous variables between groups using analyzes of variance (ANOVAs). Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and continuous variables

were expressed as mean  $\pm$  error standard of main (SEM). The association between inflammatory markers and RA was evaluated using binary logistic regression analysis controlled for covariates that may confound the association of interest. Automatic stepwise binary logistic regressions analyze were employed to delineate the most significant variables that are associated with positive RF and anti-CCP. To delineate the predictors of TNF- $\alpha$  levels, we carried out 3 different automatic stepwise linear regression (1# positive RF, 2# positive anti-CCP and 3# positive RF/anti-CCP) according *TNF- $\beta$  +252 G>A* polymorphism. All statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 24. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results.

## RESULTS

Table 1 shows the characteristics of patients with RA versus controls. Patients with RA were older ( $p=0.008$ ), had higher BMI ( $p<0.001$ ) and higher frequency of smoking ( $p=0.002$ ) than controls. Therefore, we have adjusted the results for possible effects of age, BMI, and smoking by entering the variables as additional factors or covariates in multivariate analyses. There were no significant differences in sex ( $p=0.101$ ) and ethnicity ( $p=0.112$ ) between both study groups. The outcome of ANOVAs performed on the different inflammatory markers showed that RA patients presented higher ESR ( $p<0.001$ ), hsCRP ( $p<0.001$ ), ferritin ( $p=0.019$ ), and TNF- $\alpha$  levels ( $p=0.010$ ) than controls. After correction, ESR, hsCRP, and TNF- $\alpha$  remained significantly increased in RA patients ( $p<0.001$ ).

The genotype distribution of *TNF- $\beta$  +252 G>A* polymorphism in controls and patients were consistent with those expected from the Hardy–Weinberg equilibrium ( $p>0.05$ ). In RA patients, we identified 42.1% B2/B2 homozygotes, 47.9% B1/B2 heterozygotes, and 10.0% B1/B1 homozygotes, resulting in allele frequencies of 66.0% and 34.0% for B2 and B1 alleles, respectively. No differences were observed in allele frequency and genotype distribution when evaluated in an additive or in a dominant model, among patients and controls before and after correction by age, BMI and smoking ( $p>0.05$ ). The dominant model allows to examine the association between B1 allele and biomarkers; therefore, this model was used for sequential analysis (B2/B2 vs B1/B2+B1/B1) (Table 1).

Table 2 shows the characteristics of RA patients according the *TNF- $\beta$  +252 G>A* polymorphism. Both groups did not differ in relation to sex ( $p=0.433$ ), ethnicity ( $p=0.123$ ), age ( $p=0.254$ ), BMI ( $p=0.891$ ), smoking ( $p=0.450$ ), disease duration ( $p=0.785$ ), and therapy ( $p>0.05$ ). In univariate analyses, genotypes evaluated by dominant model were not associated

with disease activity evaluated by DAS28 ESR ( $p=0.759$ ) or DAS28 CRP ( $p=0.922$ ) and inflammatory markers such as leukocytes ( $p=0.358$ ), ESR ( $p=0.619$ ), hsCRP ( $p=0.754$ ), ferritin ( $p=0.295$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0.222$ ), sTNFR1 ( $p=0.632$ ), and sTNFR2 ( $p=0.783$ ) in patients with RA ( $p>0.05$ ). However, patients carrying B1 allele presented higher RF levels ( $p=0.020$ ) and higher frequency of anti-CCP positivity ( $p=0.042$ ).

In order to examine the positivity of RF and anti-CCP we have carried out 2 automatic binary logistic regressions analyzes (forward stepwise) with the presence of autoantibodies as dependent variables and *TNF- $\beta$*  polymorphism, demographic (e.g. age, sex), clinical parameters (smoking, BMI, therapy, DAS28), and inflammatory markers (leukocytes, ESR, hsCRP, ferritin, TNF- $\alpha$ , sTNFR1, TNFR2) as explanatory variables (Table 3). In the first regression we analyzed the presence of RF, and showed that smoking ( $p=0.025$ , OR: 4.26), positive anti-CCP ( $p<0.001$ , OR: 14.30), and *TNF- $\beta$*  allele B1 ( $p=0.020$ , OR: 4.23) were associated with RF ( $p<0.001$ , Nagelkerke=0.385; 75.0% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 64.4% and a specificity of 84.3%); when *TNF- $\beta$*  allele B1 was excluded from the model, 71.9% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 71.1% and a specificity of 72.5%. In the second regression, we analyzed the presence of anti-CCP, and showed that positive RF ( $p<0.001$ , OR: 12.97) and *TNF- $\beta$*  allele B1 ( $p=0.001$ , OR: 8.13) was associated with that autoantibody ( $p<0.001$ , Nagelkerke=0.397; 71.9% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 47.8 % and a specificity of 94.0%); when *TNF- $\beta$*  allele B1 was excluded from the model, 71.9% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 69.6% and a specificity of 74.0%.

TNF- $\alpha$  levels were analyzed in patients according to the presence of autoantibodies and *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism (Figure 1). Patients with a positive RF test and B1/B2+B1/B1 genotypes showed higher TNF- $\alpha$  levels ( $p=0.040$ ) than patients with the absence of RF. There were no differences in both groups when B2/B2 genotype was evaluated ( $p=0.409$ ). sTNFR1 and sTNFR2 levels were not associated with ( $p=0.011$ ) (B), and positive RF/anti-CCP ( $p=0.038$ ) (C). P value was adjusted for sex, age, BMI, and smoking.

Furthermore, to delineate the effect of the autoantibodies and the most important variables that affect TNF- $\alpha$  levels according to genotype, we have carried out three automatic stepwise linear regression analyses with TNF- $\alpha$  as dependent variables and the demographic (e.g. age, sex), clinical (BMI, extraarticular manifestation, DAS28), and inflammatory markers data as explanatory variables (Table 4). We added positive RF (#1), anti-CCP (#2) and RF/anti-CCP (#3) in explanatory variables in three different models. Among B1/B2+B1/B1 patients, increased sTNFR1 together with positive RF, positive anti-CCP or both explained about 39.0%

of the variations in TNF- $\alpha$  levels (37.0%,  $p=0.033$ ; 39.7%,  $p=0.009$ ; and 42.8%,  $p=0.002$ , respectively). Demographic and clinical data did not contribute to TNF- $\alpha$  level in these models. Although in patients with B2/B2 genotype the presence of autoantibodies did not contribute to TNF- $\alpha$  level, DAS28 was associated with this cytokine (data not shown).

## DISCUSSION

The main findings of the present study were that the B1 allele, in heterozygosity or in homozygosity of *TNF- $\beta$  +252 G>A* polymorphism was not associated with RA susceptibility and TNF- $\alpha$  levels. However, patients with B1 allele showed a 4.23 and 8.13-fold increase in the presence of RF and anti-CCP, respectively, independently of demographic, clinical and inflammatory markers. Moreover, only patients carrying B1 allele with positive RF and/or positive anti-CCP showed higher TNF- $\alpha$  levels.

To our knowledge, this is the first study to investigate the association between the *TNF- $\beta$  +252 G>A* polymorphism with RA susceptibility in Brazilian population. The results of the association between RA susceptibility and *TNF- $\beta$  +252 G>A* have been conflicting in different populations. The absence of association of this single nucleotide polymorphism (SNP) with RA susceptibility obtained in the present study is in agreement with studies carried out in Belgian<sup>33</sup> and Spanish population<sup>32</sup>. In addition, a meta-analysis performed by Zhang and colleagues (2015) showed that *TNF- $\beta$  +252 G>A* polymorphism was not significantly associated with RA in allele, dominant, recessive and additive models. Similarly, stratification by ethnicity verified no association between this polymorphism and RA under all models in Caucasians and non-Caucasians<sup>39</sup>. However, other studies showed positive association between B1 allele and RA susceptibility<sup>29,30</sup>. On the other hand, the B2 allele was associated with RA susceptibility in Portuguese<sup>22</sup>, Egyptian<sup>31</sup> and Japanese population<sup>34</sup>. This discrepancy could be explained by different sample sizes and genetic differences among populations.

Both auto-antibodies, RF and anti-CCP, are regarded as serological markers of RA and the specificity for RA can be further increased by combining the presence of these two antibodies<sup>6,7</sup>. Furthermore, RF and anti-CCP can be found very early, and even may precede clinical symptoms of RA by years. In addition, RF and anti-CCP are biomarkers of worse prognostic and are important to define treatment<sup>40</sup>. In the present study, we demonstrated that B1 allele (B1/B2+B1/B1 genotypes) contributes to the presence of autoantibodies in RA patients, independently of demographic, clinical and inflammatory markers. Previously, only two studies evaluated the association between *TNF- $\beta$  +252 G>A* polymorphism with RF and

anti-CCP positivity in RA patients, and reported that B1 allele or B1/B1 genotype were not associated with these autoantibodies<sup>28,29</sup>. No study has reported association between *TNF-β* +252 G>A polymorphism and autoantibodies in autoimmune diseases<sup>20,23</sup>. In addition, our data demonstrated that in models performed to predict RF and anti-CCP positivity, the presence of B1 allele improved the specificity in 11.8% and 20.0%, respectively. Interestingly, B1 allele and smoking present similar OR with the presence of RF (4.23 and 4.26, respectively). Cigarettes are known as an important environmental factor associated with an enhanced frequency and incidence of RA<sup>41</sup>.

Autoantibodies have been suggested to increase disease activity due to the immune complex formation and subsequent increases in production of pro-inflammatory cytokines<sup>11,12</sup>. Several studies have shown that positive RF is associated with more aggressive forms of the disease, presumably because RF has direct effects on osteoclast genesis and chondrocyte activation<sup>8,42</sup>, whereas the presence of anti-CCP is an independent predictor of radiological damage and progression<sup>9,10</sup>.

TNF- $\alpha$  changes according to the *TNF-β* +252 G>A polymorphism were not found in the present study. However, only patients carrying B1 allele (B1/B2+B1/B1 genotypes) and with RF and/or anti-CCP presented higher TNF- $\alpha$  levels than patients with negative autoantibodies. Meanwhile, in patients with the B2 allele the positivity of these autoantibodies did not alter TNF- $\alpha$  level. In a small Egyptian cohort, RA patients with B1/B1 genotype presented higher TNF- $\alpha$  levels compared to B2/B2 genotype, but this result may be analyzed with caution, because the genotypic frequencies were not in Hardy-Weinberg equilibrium, and the B1/B1 genotype was obtained in only six patients<sup>43</sup>. In addition, a previous study showed that B1/B1 genotype was associated with higher CRP levels, but not with TNF- $\alpha$ , sTNFR1, or interleukin (IL)-6 levels in RA patients<sup>22</sup>.

This is the first study to show that the interaction between *TNF-β* +252 G>A polymorphism and RF and/or anti-CCP may be modulated by TNF- $\alpha$  levels, independently of disease activity. Furthermore, we verified through automatic linear regression the most important variables which affect this cytokine, and only in patients carrying B1 allele, the autoantibodies contributed to TNF- $\alpha$  level. Among B1/B2+B1/B1 patients, increased sTNFR1 together with positive RF and/or anti-CCP explained about 39.0% the variations in TNF- $\alpha$  levels (37.0%, 39.7% and 42.8% in relation to RF, anti-CCP and RF/anti-CCP models, respectively). This might suggest the possible association of the given polymorphism with these antibodies. Altogether, the results of the current study allow suggesting that the presence of B1

allele with the concomitant production of RF and anti-CCP may propitiate a microenvironment which favors TNF- $\alpha$ .

Patients with high levels of anti-CCP have high levels of proinflammatory molecules, such as TNF- $\alpha$  and IL-6<sup>44</sup>. In addition, the concomitant presence of RF and anti-CCP was associated with more severe erosive bone damage<sup>45</sup>, increased disease activity and higher TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 and IL-17 levels<sup>13</sup>. Recently, Takeuchi and colleagues (2017) showed that TNF- $\alpha$  level was the only baseline characteristic that positively correlated with both RF and anti-CCP<sup>14</sup>.

In conclusion, our findings indicate that the *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism was not associated with RA susceptibility and TNF- $\alpha$  plasma levels in Brazilian patients. However, allele B1 was associated with the presence of autoantibodies and associated with progression of disease. In addition, this is the first study to show that the interaction among the presence of B1 allele and autoantibodies were associated with plasma TNF- $\alpha$  increased levels in RA patients.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The study was supported by grants from the Coordination for the Improvement of Higher Level of Education Personnel (CAPES) of Brazilian Ministry of Education; Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); and State University of Londrina (PROPPG). We thank the University Hospital of State University of Londrina for technical supports.

## **DISCLOSURE**

The authors have declared no conflicts of interest.

## **AUTHOR CONTRIBUTION**

FAM, DFA, MABL,ERDA, TF, and NLM performed the laboratory analyzes; TMVI and NTC: enhanced patient care; DFA and ANCS: performed the statistical analyzes; FAM, DFA, ER, MABL, ERDA and ANCS: did the study design, discussed and interpreted the results obtained the results; ID and ANCS: they wrote the manuscript

## REFERENCES

- 1 Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; **376**: 1094–1108.
- 2 Isaacs JD. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 605–611.
- 3 Li S, Yu Y, Yue Y, Zhang Z, Su K. Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis. *J Clin Cell Immunol* 2013; **4**.
- 4 Weyand CM, Goronzy JJ. Association of MHC and rheumatoid arthritis: HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; **2**: 212.
- 5 Saad MN, Mabrouk MS, Eldeib AM, Shaker OG. Identification of rheumatoid arthritis biomarkers based on single nucleotide polymorphisms and haplotype blocks: A systematic review and meta-analysis. *J Adv Res* 2016; **7**: 1–16.
- 6 Sun J, Zhang Y, Liu L, Liu G. Diagnostic accuracy of combined tests of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* 2014; **32**: 11–21.
- 7 Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S *et al*. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; **146**: 797–808.
- 8 Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor determines structural progression of rheumatoid arthritis dependent and independent of disease activity. *Ann Rheum Dis* 2013; **72**: 875–80.
- 9 Forslind K, Ahlmén M, Eberhardt K, Hafström I, Svensson B. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004; **63**.
- 10 Rönnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L *et al*. Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann Rheum Dis* 2005; **64**: 1744–9.
- 11 Laurent L, Anquetil F, Clavel C, Ndongo-Thiam N, Offer G, Miossec P *et al*. IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**: 1425–1431.
- 12 Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M *et al*. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  through Fc $\gamma$  receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 678–688.
- 13 Sokolove J, Johnson DS, Lahey LJ, Wagner CA, Cheng D, Thiele GM *et al*. Rheumatoid Factor as a Potentiator of Anti-Citrullinated Protein Antibody-Mediated Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014; **66**: 813–821.
- 14 Takeuchi T, Miyasaka N, Inui T, Yano T, Yoshinari T, Abe T. High titers of both rheumatoid factor and anti-CCP antibodies at baseline in patients with rheumatoid arthritis are associated with increased circulating baseline TNF level, low drug levels, and reduced clinical responses: a post hoc analysis of the RI. 2017: 1–11.
- 15 Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Nakazawa F, Uzuki M, Sawai T *et al*. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology (Oxford)* 2002; **41**: 329–337.
- 16 Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2017; **13**: 217–233.
- 17 Petrovic-Rackov L, Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-

- measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2006; **25**: 448–452.
- 18 Posch PE, Cruz I, Bradshaw D, Medhekar BA. Novel polymorphisms and the definition of promoter “alleles” of the tumor necrosis factor and lymphotoxin  $\alpha$  loci: inclusion in HLA haplotypes. *Genes Immun* 2003; **4**: 547–558.
- 19 El-Tahan RR, Ghoneim AM, El-Mashad N. TNF- $\alpha$  gene polymorphisms and expression. *Springerplus* 2016; **5**: 1508.
- 20 Umare VD, Pradhan VD, Rajadhyaksha AG, Patwardhan MM, Ghosh K, Nadkarni AH. Impact of TNF- $\alpha$  and LT $\alpha$  gene polymorphisms on genetic susceptibility in Indian SLE patients. *Hum Immunol* 2017; **78**: 201–208.
- 21 Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR *et al.* Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991; **173**: 209–19.
- 22 Santos MJ, Fernandes D, Caetano-Lopes J, Perpetuo IP, Vidal B, Canhao H *et al.* Lymphotoxin- $\alpha$  252 G>A polymorphism: A link between disease susceptibility and dyslipidemia in rheumatoid arthritis? *J Rheumatol* 2011; **38**: 1244–1249.
- 23 Parks CG, Pandey JP, Dooley MA, Treadwell EL, St. Clair EW, Gilkeson GS *et al.* Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF- $\beta$  in a population-based study of systemic lupus erythematosus: Associations and interaction with the interleukin-1 $\alpha$ -889 C/T polymorphism. *Hum Immunol* 2004; **65**: 622–631.
- 24 Kallaur AP, Oliveira SR, Simão ANC, De Almeida ERD, Morimoto HK, Lopes J *et al.* Tumor necrosis factor beta (TNF- $\beta$ ) NcoI polymorphism is associated with multiple sclerosis in Caucasian patients from Southern Brazil independently from HLA-DRB1. *J Mol Neurosci* 2014; **53**: 211–221.
- 25 26 Pandey JP, Takeuchi F. TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  gene polymorphisms in systemic sclerosis. *Hum Immunol* 1999; **60**: 1128–1130.
- 27 Bolstad AI, Le Hellard S, Laddha NC, Dwivedi M, Gani AR, Mansuri MS, Begum R. Tumor necrosis factor B (TNFB) genetic variants and its increased expression are associated with vitiligo susceptibility. *PLoS One* 2013; **8**: e81736. Kristjansdottir G, Vasaitis L, Kvarnström M, Sjöwall C *et al.* Association between genetic variants in the tumour necrosis factor/lymphotoxin  $\alpha$ /lymphotoxin  $\beta$  locus and primary Sjögren’s syndrome in Scandinavian samples. *Ann Rheum Dis* 2012; **71**: 981–988.
- 28 Al-Rayes H, Al-Swailem R, Albelawi M, Arfin M, Al-Asmari A, Tariq M. TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  gene polymorphism in Saudi rheumatoid arthritis patients. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 2011; **4**: 55–63.
- 29 Panoulas VF, Nikas SN, Smith JP, Douglas KMJ, Nightingale P, Millionis HJ *et al.* Lymphotoxin 252A>G polymorphism is common and associates with myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; **67**: 1550–6.
- 30 Karray EF, Bendhifallah I, Benabdelghani K, Hamzaoui K, Zakraoui L. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in regional Tunisian population. *J Infect Dis Immun* 2011; **3**: 30–35.
- 31 Saad MN, Mabrouk MS, Eldeib AM, Shaker OG. Genetic case-control study for eight polymorphisms associated with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2015; **10**: 1–15.
- 32 Vinasco J, Beraún Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E *et al.* Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; **49**: 74–8.
- 33 Vandevyver C, Raus P, Stinissen P, Philippaerts L, Cassiman JJ, Raus J. Polymorphism of the tumour necrosis factor beta gene in multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet* 1994; **21**: 377–82.
- 34 Takeuchi F, Nabeta H, Hong GH, Kawasugi K, Mori M, Matsuta K *et al.* The genetic contribution of the TNFa11 microsatellite allele and the TNFb + 252\*2 allele in Japanese

- RA. *Clin Exp Rheumatol* 2005; **23**: 494–8.
- 35 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 1580–1588.
- 36 Prevoe MLL, Van't Hof MA, Kuper HH, Van Leeuwen MA, Van De Putte LBA, Van Riel PLCM. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; **38**: 44–48.
- 37 Brazil. Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe. Charact. Popul. Households Results Universe. 2011. [http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B\\_%7Dda%7B\\_%7Dpopulacao/default%7B\\_%7Dcaracteristicas%7B\\_%7Dda%7B\\_%7Dpopulacao.shtm](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao/default%7B_%7Dcaracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao.shtm). (accessed 8 Feb2015).
- 38 Delongui F, Carvalho Grion CM, Ehara Watanabe MA, Morimoto HK, Bonametti AM, Maeda Oda JM *et al.* Association of tumor necrosis factor  $\beta$  genetic polymorphism and sepsis susceptibility. *Exp Ther Med* 2011; **2**: 349–356.
- 39 Zhang C, Zhao MQ, Liu J, Huang Q, Li P, Ni J *et al.* Association of lymphotoxin alpha polymorphism with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 2015; **18**: 398–407.
- 40 Rantapää-Dahlqvist S, De Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H *et al.* Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 2741–2749.
- 41 Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin J II. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 22279–22295.
- 42 Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* 2012; **11**: 234–250.
- 43 Shaker OG, Alnoury AM, Hegazy GA, El Haddad HE, Sayed S, Hamdy A. Redutase, Fator De Crescimento Transformador B1 E Linfotoxina-A E Susceptibilidade À Artrite Reumatoide. *Rev Bras Reumatol* 2016; **56**: 414–420.
- 44 Vázquez-Del Mercado M, Nuñez-Atahualpa L, Figueroa-Sánchez M, Gómez-Bañuelos E, Rocha-Muñoz AD, Martín-Márquez BT *et al.* Serum Levels of Anticyclic Citrullinated Peptide Antibodies, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$ , and C-Reactive Protein Are Associated with Increased Carotid Intima-Media Thickness: A Cross-Sectional Analysis of a Cohort of Rheumatoid Arthrit. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 1–10.
- 45 Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K *et al.* Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**: 2151–2156.

**Table 1** Socio-demographic variables and genotype frequencies of *TNF-β* +252 G>A polymorphism in patients with rheumatoid arthritis (RA) and controls.

	Control (n=297)	RA (n=261)	df	F/X <sup>2</sup>	p	p <sup>a</sup>
Age (years)*	51.66 (1.02)	55.07 (0.72)	1/551	7.084	0.008	-
Sex (F/M)	229 (78.4) / 63 (21.6)	219 (83.9) / 42 (16.1)	1	2.694	0.101	-
Ethnicity (C/NC)	224 (76.7) / 68 (23.3)	178 (70.4) / 75 (29.6)	1	2.598	0.112	-
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.24 (0.28)	28.06 (0.36)	1/530	15.89	<0.001	-
Smoking	19 (7.0)	41 (15.8)	1	10.060	0.002	-
Leukocytes(cells/uL)	6726 (197)	7641 (552)	1/364	1.104	0.294	0.333
ESR (mm/H)*	12.44 (0.81)	23.65 (20.21)	1/380	34.925	<0.001	<0.001
hsCRP (mg/L)*	3.12 (0.26)	9.83 (0.96)	1/540	48.505	<0.001	<0.001
Ferritin (ng/L)*	129.50 (8.36)	159.70 (9.75)	1/537	5.573	0.019	0.266
TNF-α (pg/mL)*	11.34 (5.35)	58.57 (12.45)	1/154	6.850	0.010	<0.001
TNF-β genotyping						
B1 Allele	201 (34.4)	177 (34.0)	1/1105	0.031	0.858	0.839
B2 Allele	383 (65.6)	345 (66.0)				
B1/B1	31 (10.6)	26 (10.0)	2	0.064	0.968	0.861
B1/B2	139 (47.6)	125 (47.9)				
B2/B2	122 (41.8)	110 (42.1)				
Dominant model						
B2/B2	122 (41.8)	110 (42.1)	1	0.008	0.931	0.824
B1/B2+B1/B1	170 (58.2)	151 (57.9)				

Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) or mean and standard error of the mean (SEM).  
<sup>a</sup>Adjusted for age, BMI and smoking. \*Data were processed in natural logarithm (Ln) transformation. BMI: body mass index; ESR: erythrocyte sedimentation rate; hsCRP: high sensitive C reactive protein; TNF-α: tumor necrosis factor α; TNF-β: tumor necrosis factor β; B1/B1 homozygous genotype for the allele B1 (with guanine at position +252 in the first intron of the TNF-β gene); B2/B2 homozygous genotype for the allele B2 with adenine at position +252 in the first intron of the TNF-β gene; B1/B2 heterozygous genotype

**Table 2** Demographic, clinical, and inflammatory markers according to *TNF-β* +252 G>A polymorphism in rheumatoid arthritis (RA) patients

	<b>B2/B2 (n=110)</b>	<b>B1/B2+B1/B1 (n=151)</b>	<b>df</b>	<b>F/X<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
Age (years)	56.12 (0.97)	54.45 (1.03)	1/258	1.306	0.254
Sex (F/M)	90 (81.8) / 20 (18.2)	129 (85.2) 22 (14.6)	1	0.615	0.433
Ethnicity (C/NC)	70 (64.8) / 30 (35.2)	107 (73.8) 38 (26.2)	1	0.237	0.123
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.12 (0.53)	28.02 (0.49)	1/254	0.019	0.891
Smoking	26 (17.2)	15 (13.8)	1	0.570	0.450
Disease duration (years)*	12.32 (0.96)	12.06 (0.81)	1/256	0.075	0.785
DAS 28 ESR	3.72 (0.13)	3.77 (0.12)	1/253	0.094	0.759
DAS 28 CRP*	3.38 (0.13)	3.40 (0.12)	1/253	0.010	0.922
Anti-CCP (positive)	83 (55.0)	71 (67.6)	1	4.136	0.042
Anti-CCP (U/mL) *	161.66 (29.20)	197.47 (55.46)	1/256	1.788	0.182
RF (positive)	53 (49.1)	80 (53.0)	1	0.385	0.535
RF (U/mL) *	75.67 (12.08)	149.88 (24.15)	1/257	5.466	0.020
Leukocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	7389 (276)	6956 (186)	1/257	0.848	0.358
ESR (mm/H) *	22.76 (1.90)	24.29 (1.68)	1/255	0.248	0.619
hsCRP (mg/L) *	10.94 (1.72)	9.01 (1.08)	1/258	0.098	0.754
Ferritin (ng/mL) *	168.32 (14.57)	153.43 (13.12)	1/257	1.101	0.295
TNF-α (pg/mL) *	52.54 (8.90)	62.19 (19.25)	1/102	1.510	0.222
sTNFR1 (pg/mL) *	1159.86 (82.19)	1179 (1069.76)	1/103	0.034	0.632
<b>Treatment</b>					
Prednisone	77 (70.0)	102 (67.5)	1	0.177	0.647
Metrotexate	72 (65.5)	102 (67.5)	1	0.126	0.723
TNF-inhibitor	27 (24.5)	37 (24.5)	1	0.000	0.994
Leflunomide	46 (41.8)	61 (40.4)	1	0.053	0.818
Antimalarials	37 (33.6)	62 (41.1)	1	1.490	0.222

Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) or mean and standard error of the mean ( $\pm$ SEM).

\*Data were processed in natural logarithm (Ln) transformation.

TNF-β: tumor necrosis factor β; B1/B1 homozygous genotype for the allele B1 (with guanine at position +252 in the first intron of the TNF-β gene); B2/B2 homozygous genotype for the allele B2 with adenine at position +252 in the first intron of the TNF-β gene; B1/B2 heterozygous genotype; BMI: body mass index; RF: rheumatoid factor; anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; ESR: erythrocyte sedimentation rate; hsCRP: high sensitive C reactive protein; TNF-α: tumor necrosis factor α; sTNFR1: tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR2: tumor necrosis factor receptor 2.

**Table 3** Results of binary logistic regressions analyses (forward stepwise) with rheumatoid factor (RF) and/or anti-cyclic citrullinated peptide (Anti-CCP) as dependent variable and demographic, clinical, inflammatory, and *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism as explanatory variables.

Dependent variables	Explanatory variables	SEM	Wald	<i>p</i>	OR (95% CI)
RF (+)	Smoking	0.648	5.003	0.025	4.263 (1.196-15.187)
	Anti-CCP (+)	0.619	18.467	<0.001	14.305 (4.251-40.136)
	<i>TNF-<math>\beta</math></i> +252 G>A	0.621	5.401	0.020	4.231 (1.254-14.279)
Anti-CCP (+)	RF (+)	0.597	18.426	<0.001	12.974 (4.026-41.814)
	<i>TNF-<math>\beta</math></i> +252 G>A	0.616	11.570	0.001	8.139 (2.432-27.245)

SEM: standard error of the mean; OR: odds ratio; CI: confidence interval; *TNF- $\beta$* : tumor necrosis factor  $\beta$ ; B1/B1 homozygous genotype for the allele B1 (with guanine at position +252 in the first intron of the *TNF- $\beta$*  gene); B2/B2 homozygous genotype for the allele B2 with adenine at position +252 in the first intron of the *TNF- $\beta$*  gene; B1/B2 heterozygous genotype; RF: rheumatoid factor; anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; *TNF- $\alpha$* : tumor necrosis factor  $\alpha$ .

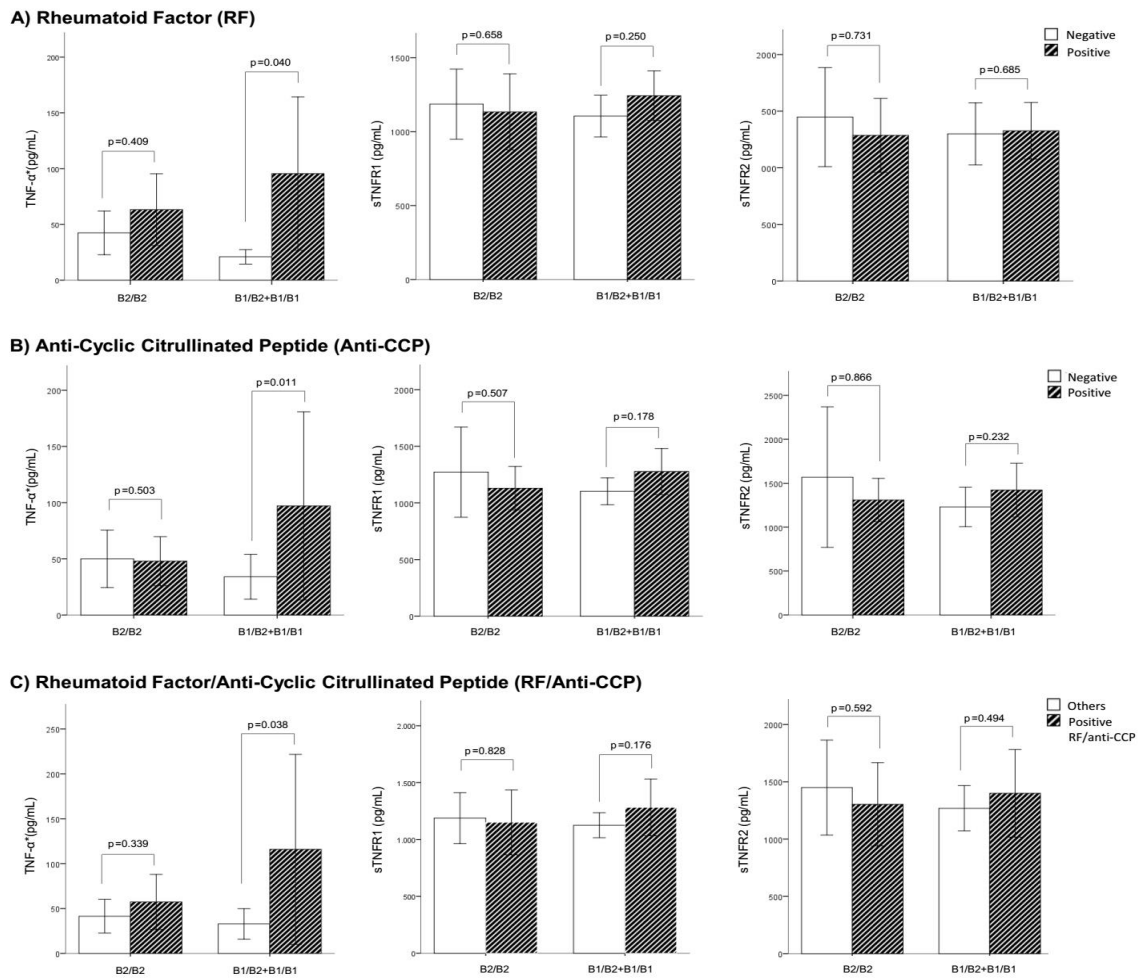
**Table 4.** Results of stepwise linear regression analyses with TNF- $\alpha$  as dependent variable and presence of rheumatoid factor and/or anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) and demographic, clinical and inflammatory data as explanatory variables according *TNF- $\beta$  +252 G>A* polymorphism.

	Genotyping	Dependent	Explanatory variables			F	df	p	R <sup>2</sup> (%)
			Variables	T	p				
#1	B2/B2	TNF- $\alpha$ *	DAS28	2.632	0.040	5.729	1/35	0.007	20.4
			CRP*						
	B1/B2+B1/ B1	TNF- $\alpha$ *	sTNFR1*	5.38	<0.001	18.19	2/56	<0.001	37.2
			RF (+)						
#2	B2/B2	TNF- $\alpha$ *	DAS28	3.260	0.002	10.657	1/35	0.002	21.2
			CRP*						
	B1/B2+B1/ B1	TNF- $\alpha$ *	sTNFR1*	5.309	<0.001	29.642	2/55	<0.001	39.7
			Anti-CCP (+)						
#3	B2/B2	TNF- $\alpha$ *	DAS28	3.265	0.002	10.657	1/35	0.002	21.2
			CRP*						
	B1/B2+B1/ B1	TNF- $\alpha$ *	sTNFR1*	5.609	<0.001	22.699	2/55	<0.001	42.8
			RF (+)						
			Anti-CCP (+)						

\*Those data are processed in Ln transformation.

TNF- $\beta$ : tumor necrosis factor  $\beta$ ; B1/B1 homozygous genotype for the allele B1 (with guanine at position +252 in the first intron of the TNF- $\beta$  gene); B2/B2 homozygous genotype for the allele B2 with adenine at position +252 in the first intron of the TNF- $\beta$  gene; B1/B2 heterozygous genotype; TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; RF: rheumatoid factor; anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide; sTNFR1: tumor necrosis factor receptor 1.

#1 = Positive FR. #2 = Positive anti-CCP. #3 Positive FR and anti-CCP.



**Figure 1.** Data expressed in mean and 95% confidence interval. TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 levels according *TNF- $\beta$*  +252 G>A polymorphism and the presence of autoantibodies.

## 7.0 CONCLUSÕES

- Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição genotípica e alélica entre pacientes com AR e controles;
- O polimorfismo *TNF-β* +252 G>A (rs909253) não foi associado com a susceptibilidade à AR ou com os níveis plasmáticos de *TNF-α*;
- De acordo com o modelo dominante, pacientes com AR e o alelo B1 apresentaram maiores níveis de FR quando comparados a pacientes com genótipo B2/B2. A presença do alelo B1 confere 4,23 vezes maior chance de positividade do FR, independentemente dos dados demográficos, clínicos e inflamatórios;
- Não foi encontrada associação do polimorfismo *TNF-β* +252 G>A e a atividade da doença avaliada pelo DAS28-VHS e DAS28-PCR.
- Pacientes com AR e alelo B1 apresentaram níveis elevados de anti-CCP quando comparados a pacientes com o alelo B2 em homozigose. Pacientes com alelo B1 apresentaram 8,139 maior chance de apresentarem positividade para anti-CCP, independentemente dos dados demográficos, clínicos e inflamatórios.
- Os receptores sTNFR1 e sTNFR2 não diferiram de acordo com a presença de autoanticorpos e polimorfismo *TNF-β* +252 G>A. Em pacientes que apresentavam o alelo B1, o aumento no sTNFR1 acompanhado de FR e/ou anti-CCP, pôde explicar cerca de 39,0% da variação nos níveis de *TNF-α*;
- Em pacientes com os genótipos B1/B2+B1/B1, maiores níveis plasmático de *TNF-α* foram associados com a presença de auto anticorpos, mas não no genótipo B2/B2. O FR, anti-CCP ou ambos podem modular os níveis plasmáticos do *TNF-α* apenas em pacientes que apresentam o alelo B1, independentemente da atividade da doença.
- O presente estudo também demonstrou interação entre autoanticorpos (FR e anti-CCP) com o *TNF-β* +252 G>A, sendo essas interações importantes para a fisiopatologia da AR. Uma vez que a presença desses autoanticorpos tem sido associada a um pior prognóstico da AR, a presença do polimorfismo *TNF-β* +252 G>A pode contribuir para determinação da conduta terapêutica a ser adotada.

## 8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo a demonstrar a interação entre a presença do alelo B1 e a presença de anticorpos associados a progressão da doença, anti-CCP e FR, e está associada ao aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em pacientes com AR.

Os dados do presente estudo podem subsidiar novos estudos que avaliem a eficácia terapêutica de fármacos inibidores do TNF- $\alpha$  em pacientes com AR de acordo com a presença do polimorfismo *TNF- $\beta$  +252 G>A*.

## 9.0 REFERENCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **IMUNOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- ALETAHA D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis** v. 69, p. 1580-1588, 2010. Doi: 10.1136/ard.2010.138461.
- AL-RAYES, H.; AL-SWAILEM, R.; ALBEWI, M.; ARFIM, M.; AL-ASMARI, A.; TARIQ, M. TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  gene polymorphism in Saudi rheumatoid arthritis patients. **Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord**, v. 4, p. 55-63, 2011.
- ANGELOTTI F. et al. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.**, v.35, n. 3, p. 368-378, 2017.
- arthritis compared with anti-cyclic citrullinated peptide. **J Rheumtol**, v. 38, p. 828-834 2011. doi: 10.3899/jrheum.101143.
- BLOCK, D. R. et al. Analytical and clinical comparison of anti-CCP assays with rheumatoid factor for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Clin Chim Acta**, v. 2012, p. 1015-1017, 2012.
- BOLSTAD, A. I.; HELLARD, S. L.; LADDHA, N. C.; DWIVEDI, M.; GANI, A. R.; MANSURI, M. S.; BEGUM, R. Tumor necrosis factor B (TNFB) genetic variants and its increased expression are associated with vitiligo susceptibility. **PLoS One**, v. 8, p. 817-836, 2013.
- CHIMENTI, M. S. et al. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis. **Cell Death Dis**, v.17, n. 6, 2015. doi:10.1038/cddis.2015.246.
- CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 3 n. 11, p. 51, 2012.
- CROFT, M.; SIEGEL, R. M. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, p. 217-233, mar, 2017. doi:10.1038/nrrheum.2017.22
- DAVIS, M. J. et al. Comparison an evaluation of a disease activity index for use in patients with rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**, v. 29, p. 111-115, 1990.
- DELONGUI, F.; GRION, C. C. M.; EHARA, M., A., W.; MORIMOTO, H. K.; BONAMETTI, A. M.; ODA, J. M. M. *et al.* Association of tumor necrosis factor  $\beta$  genetic polymorphism and sepsis susceptibility. **Exp Ther**, n. 2, p. 349-356, 2011.

- EL-TAHAN, R. R.; GHONEIM, A. M.; EL-MASHAD, N. TNF- $\alpha$  gene polymorphisms and expression. **Springerplus**, v. 5, p. 1508, 2016.
- FRANSEN, J. et al. Disease Activity Scores using C-reactive protein: CRP may replace ESR in the assessment of RA disease activity. **Ann Rheum Dis**, v. 62, p. 151, 2004.
- GOETZ, F. W.; PLANAS, J. V.; MACKENZI, S. Tumor necrosis factors. **Elsevier**, n. 28, p. 487-497, 2004.
- GREMESE, E.; FERRACCIOLI, G. The metabolic syndrome: The crossroads between rheumatoid arthritis and cardiovascular risk. **Elsevier**, v. 10, p. 582-589, aug, 2011.
- HOLMES, C. L.; RUSSEL, J. A., WALLEY, K. R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock-role in prognosis and potential for therapy. **Ches**, v. 3, n. 124, p. 1103-1115, 2003.
- HUIZINGA, T. W. et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. **Arthritis Rheum**, v. 52, p. 3433–3438, 2005. doi: 10.1002/art.21385.
- HUIZINGA, T. W. et al. TNF-Alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. **J. Neuroimmunol**, v. 72, p. 149-153, fev, 1997.
- INFANTINO, M. et al. Anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor isotypes in the diagnosis of rheumatoid arthritis: an assessment of combined tests. **Clin Chim Acta**, v.436, p. 237-242, 2014.
- INGEGNOLI, F.; CASTELLE, R.; GUALTIEROTTI. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. **Disease Markers**, v.35, n. 6, p. 727-734, 2013.
- INOUE E et al. Comparison of Disease Activity Score (DAS)28-erythrocyte sedimentation rate and DAS28-C-reactive protein threshold values. **Ann Rheum Dis**, v. 66, p. 407-409, 2007.
- KALLAUR, A. P.; OLIVEIRA, S. R., SIMÃO, A. N. C.; ALMEIDA, E. R. D.; MORIMOTO, H.K. Lopes J *et al.* Tumor necrosis factor beta (TNF- $\beta$ ) NcoI polymorphism is associated with multiple sclerosis in Caucasian patients from Southern Brazil independently from HLA-DRB1. **J Mol Neurosci**, v. 53, p. 221-221, 2014.
- KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews/ Rheumatology**, dez, 2015. doi:10.1038/nrrheum.
- KARRAY, E. F.; BENDHIFALLAH, I.; BENABDELGHANI, K.; HAMZAOUI K.; ZAKRAOUI, L. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in regional Tunisian population. **J Infect Dis Immun**, v. 3., p. 30-35, 2011.

- KLARESKOG, L. et al. Mechanisms of disease: genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 2, p. 425-433, 2006.
- LADDHA, N. C.; DWIVEDI, M.; GANI, A. R.; MANSURI, M. S.; BEGUM, R. Tumor necrosis factor B (TNFB) genetic variants and its increased expression are associated with vitiligo susceptibility. **PLoS One**, v. 8, p. 817-836, 2013.
- LU, L. Y. et al. Tumor necrosis factor-beta + 252 polymorphism in associated with systemic lupus erythematosus in Taiwan. **J Formos Med Assoc**, v. 104, n. 8, p. 563-570, aug, 2005.
- MAJETSCHAK, M. et al. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. **Ann Surg**, v. 230, n. 2, p. 207-214, aug., 1999.
- MAJETSCHAK, M. et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 6, p. 1205-1211, nov., 2002.
- MANARA, M.; SINIGAGLIA, L. Bone and TNF in rheumatoid arthritis: clinical implications. *Rheumatic & Musculoskeletal Diseases*. **BMJ Journal**, v. 1, aug, 2015.
- MANEIRO, R. J. et al. Rheumatoid factor as predictor of response to abatacept, rituximab and tocilizumab in rheumatoid arthritis: Systematic review and meta-analysis. **Semin Arthritis Rheum**, v. 43, p. 9-17, 2013.
- MCINNES, I. B.; SCHETT. G. Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **The new england journal of medicine**, v. 23, p. 2205-2219, 2011.
- MEDEIROS et al. Correlation of rheumatoid arthritis activity indexes (Disease Activity Score 28 measured with ESR and CRP, Simplified Disease Activity Index and Clinical Disease Activity Index) and agreement of disease activity states with various cut-off points in a Northeastern Brazilian population. **Rev Bras Reumatol**, v.55, n. 6, p. 477-484, 2015.
- MERONI, P. L.; VALESINI, G. Tumour necrosis factor a antagonists in the treatment of rheumatoid arthritis: an immunological perspective. **Bio Drugs**. v. 28, n. 1 p. 5-13, abr, 2014.
- MESSER, G.; Spengler, U; Jung, M. C.; Honold, G.; Blömer, K. Pape GR *et al*. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. **J Exp Med**, v. 173, p. 209–19, 1991.
- MIHALY, S. R.; NINOMIYA-TSUJI, J.; MORIOKA, S. T. Control of cell death. **Cell Death Differ**, v. 21, p. 1667–1676, 2014.

- OLIVIER, N. et al. Chronic disease list conditions in patients with rheumatoid arthritis in the private healthcare sector of South Africa. **Rheumatol Int, dez**, 2017. doi: 10.1007/s00296-017-3907.
- ORR, C. et al. Novel Immunophenotype and anti-citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis patients: Relationship to treatment response and radiologic prognosis. **Arthritis Rheumatol**, v. 69, n. 11, p.2114-2123. 2017 doi: 10.1002/art.40218.
- PANDEY, J. P.; TAKEUCHI, F. Takeuchi F. TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  gene polymorphisms in systemic sclerosis. **Hum Immunol**, v. 60, p. 1128-1130, 1999.
- PANOULAS, V. F.; NIKAS, S. N.; SMITH, J. P.; DOUGLAS, K. M. J.; NIGHTINGALE, P.; MILIONIS, H. J. *et al.* Lymphotoxin 252A> G polymorphism is common and associates with myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v. 67, p. 1550-1556, 2008.
- PARHAM, PETER. T-cell mediated immunity. The immune system, 2nd edn. **Garland Science**, n. 6, p 172., 2005. ISBN 0-8153-4093-1
- PARKS, C.G.; PANDEY, J. P.; DOOLEY, M. A.; TREADWELL, E. L.; CLAIR, E. W. S.; GILKESON, G. S. *et al.* Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF- $\beta$  in a population-based study of systemic lupus erythematosus: Associations and interaction with the interleukin-1 $\alpha$ -889 C/T polymorphism. **Hum Immunol**, v. 65, p. 622-631, 2004.
- POSCH, P. E. et al. Novel polymorphisms and the definition of promoter “alleles” of the tumor necrosis factor and lymphotoxin  $\alpha$  loci: inclusion in HLA haplotypes. **Genes Immun**, v.4, p 547–558, 2003.
- PREVOO, M. L. L. et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 38, n. 1, p. 44-48, 1995.
- PRUIJIN, G. J.; WIJK, A.; van VENROOIJ, W. J. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research Therapy**, fev, 2010. doi: 10.1186/ar2903.
- PRUIJIN, G. J.; WIJK, A.; van VENROOIJ, W. J. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 1, p. 203, fev, 2010. doi: 10.1186/ar2903.
- SAAD, M. N.; MABROUK, M. S.; ELDEIB, A. M.; SHAKER, O. G. Genetic case-control study for eight polymorphisms associated with rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v. 10, p. 1-15, 2015.

SAKKAS L. I. et al. The infectious basis of ACPA-Positive rheumatoid arthritis. **Front Microbiol**, v.17, n. 8, p. 1853, set, 2017. doi: 10.33.89/fmicb.2017.01853.

SALGADO, E. Rheumatoid factor and response to TNF antagonists in rheumatoid arthritis: Systematic review and meta-analysis of observational studies. **Joint Bone Spine**, v. 81, p. 41-50, 2014.

SANTOS, M. J.; FERNANDES, D.; CAETANO-LOPES, J.; PERPETUO, I. P.; VIDAL, B.; CANHAO, H. *et al.* Lymphotoxin- $\alpha$  252 A>G polymorphism: A link between disease susceptibility and dyslipidemia in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v.38, p. 1244-1249, 2011.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094-1108, set, 2010.

SEEGOBIN, S. D. et al. ACPA- Positive and ACPA-Negative rheumatoid arthritis differ in their requirements for combination dmards and corticosteroids: Secondary analysis of a randomized controlled trial. **Arthritis Research Therapy**, jan, 2014. doi: 10.1186/ar4439.

SHAKER, O. G.; ALNOURY, A. M.; HEGAZY, G. A.; EL-HADDAD, H. E.; SAYED, S.; HAMDY, A. Redutase, fator de crescimento transformador B1 e Linfotóxina-A e susceptibilidade á artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v. 56, p. 414-420, 2016.

SHARMA, R. P. et al. Mice lacking both TNF alpha receptors show increased constitutive expression of INF gamma: a possible reason for lack of protection from fumonisin B1 hepatotoxicity. **Cytokine**, v. 34, p. 260-270, jun, 2006. doi: 10.1016/j.cyto.2006.06.001.

SMOLEN, J. S. et al. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1861-1874, dez, 2007.

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

SOKOLOVE, J. et al. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v.4, n.66, p.813-821, 2014.

STUBER, F. et al. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations and outcome of patients with severe sepsis. **Crit Care Med**, v. 24, p. 381-384, 1996.

TAKEUCHI, F.; NABETA, H.; HONG, G. H.; KAWASUGI, K.; MORI, M.; MATSUTA, K. *et al.* The genetic contribution of the TNF $\alpha$  11 microsatellite allele and the TNF $\beta$  + 252\*2 allele in Japanese RA. **Clin Exp Rheumatol**, v. 23, p. 494-498, 2005.

- TANTAYAKOM, P. et al. Metabolic syndrome is associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 83, p. 563–567, out, 2016.
- TEUNISSEN, C. E. et al. Consensus guidelines for CSF and blood biobanking for CNS biomarkers studies. **Multiple Sclerosis International**, jul, 2011. doi: 10.1155/2011/246412.
- UMARE, V.D. et al. Impact of TNF- $\alpha$  and LT $\alpha$  gene polymorphisms on genetic susceptibility in Indian SLE patients. **Hum Immunol**, v. 78, p. 201-208, 2017.
- VAN DER HEIJDE, D. M. F. M. et al. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. **Ann Rheum Dis**, v. 49, n. 11, p. 916-920, nov, 1990.
- VERHEUL, M. K. et al. Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. **Clin Immunology**, v. 161, n. 1, p. 2-10, nov, 2015.
- VINASCO, J.; BERAÚN, Y.; NIETO, A.; FRAILE, A.; MATARAN, L.; PAREJA, E. *et al.* Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 49, p. 74-78, 1997.
- VNADEVYVER, C. et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor beta gene in multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. **Eur J Immunogenet**, v. 21, p. 377-382, out, 1994.
- VOLIN, M. V. Soluble Adhesion Molecules in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 5, p. 633-653, 2005.
- WAALER, E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. **Acta Path et Microbiol Scandinav**, v. 17, p. 172-188, 1940.
- WATERER, G. W. et al. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. **Am J Respir Crit Care**, v. 163, p. 1599-1604, 2001.
- WEYAND, C. M. et al. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 6, n. 117, p. 801-6, nov, 1992.
- WILLEMZE, A. et al. New biomarkers in rheumatoid arthritis. **Neth J Med**, v. 70, n.9, p.392-399, 2012.
- YADAV, D. K. et al. Association of TNF-A -308G>A and TNF-B +252A>G genes polymorphisms with primary immune thrombocytopenia: a North Indian study. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.27, n. 7, p. 791-797, oct, 2016. doi:10.1097/mbc.0000000000000492.
- YANG, X.; CHANG, Y.; WIE, W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in

ZENDMAN, A. J. W.; van VENROOIJ, W. J.; PRUJIN, G. J. M. Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, n. 45, p. 20-25, 2006. doi:10.1093/rheumatology.

ZHANG, C.; ZHAO, M. Q.; LIU, J.; HUANG, Q.; LI, P.; NI, J. *et al.* Association of lymphotoxin alpha polymorphism with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. **Int J Rheum Dis**, v. 18, p. 398-407, 2015.

## 10.0 ANEXOS E APÊNDICES

### 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

**CEP:** 86.038-440

**UF:** PR **Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-2490

**E-mail:** cep268@uel.br

**Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido.****Termo de consentimento livre e esclarecido****Título da pesquisa:**

**“Avaliação do estresse oxidativo, fatores de risco cardiovasculares e frequência de síndrome metabólica em pacientes com artrite reumatoide”**

Prezado(a) Senhor(a):

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

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

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

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar: (médicas reumatologistas Neide Tomimura Costa – telefone 9921-9849 ou Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda telefone 9627-8181) ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. 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 da mesma.

\_\_\_\_\_  
(assinatura do membro da equipe que apresentou o TCLE)

Pesquisadores responsáveis

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Andréa Name Colado Simão

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Isaías Dichi

**Apêndice B. Ficha de avaliação dos pacientes com Artrite Reumatoide.****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 DIAGNÓTICO: \_\_\_\_\_

DAS28: VHS \_\_\_\_\_ PCR \_\_\_\_\_

Comprometimento sistêmico extra-articular:

Pulmonar ( ) vasculite ( ) nódulos reumatoides ( ) 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)