

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ACHADOS INFLAMATÓRIOS E DANO ESTRUTURAL VISTOS POR  
ULTRASSONOGRAFIA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE:  
CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS, LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS  
E TH-17 E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SANGUE PERIFÉRICO**

ALINE DEFAVERI DO PRADO

Porto Alegre

2016

ALINE DEFAVERI DO PRADO

**ACHADOS INFLAMATÓRIOS E DANO ESTRUTURAL VISTOS POR  
ULTRASSONOGRRAFIA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE:  
CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS, LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS  
E TH-17 E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SANGUE PERIFÉRICO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande  
do Sul para a obtenção do título de Doutor em  
Medicina e Ciências da Saúde - Área de  
Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub

Co-orientador: Dr. José Alexandre Mendonça

Porto Alegre

2016

ALINE DEFAVERI DO PRADO

**ACHADOS INFLAMATÓRIOS E DANO ESTRUTURAL VISTOS POR  
ULTRASSONOGRRAFIA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE:  
CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS, LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS  
E TH-17 E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SANGUE PERIFÉRICO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande  
do Sul para a obtenção do título de Doutor em  
Medicina e Ciências da Saúde- - Área de  
Concentração: Clínica Médica

Aprovada em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr.Rafael Mendonça Chakr - UFRGS

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rita Matiello - PUCRS

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lígia Bender - PUCRS

---

Prof. Dr.João Castro - PUCRS

---

Prof. Dr. Marcus Franck - PUCRS

Porto Alegre

2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Alberto Leite do Prado e Anagilda Defaveri do Prado, por todo o esforço ao longo da vida na educação de suas filhas.

A minha irmã, Letícia Defaveri do Prado, pela torcida e apoio.

Ao meu esposo, Ricardo Padoin Nenê, pela parceria incondicional. E a nossa filha, Antônia, que nasceu e cresceu junto com este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Esta tese foi fruto do trabalho harmonioso em equipe de pessoas resilientes e que acreditam na pesquisa e, através dela, no aperfeiçoamento pessoal e da prática clínica.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Henrique Staub, pela oportunidade e pelo apoio em desenvolver o estudo do ultrassom aliado a imunologia.

Agradeço à Dra. Inês Guimarães da Silveira e ao Dr. José Alexandre Mendonça pelo incentivo constante, pelas idéias inovadoras e desafiadoras, pelo suporte e pela coragem para colocá-las em prática.

Agradeço à Dra. Karine Rodrigues da Luz e novamente ao Dr. José Alexandre Mendonça, pioneiros no ultrassom para reumatologistas no Brasil, pelos ensinamentos, oportunidades, incentivo e apoio. Agradeço aos colegas Dr. Rafael Mendonça Chakr e Melissa Bisi pelos ensinamentos, treinamentos e parceria na aprendizagem.

Agradeço ao Dr. Mauro W Keiserman e, novamente, à Dra. Inês Guimarães da Silveira por oportunizar a minha entrada no mundo do ultrassom em reumatologia.

Agradeço ao Dr. Markus Bredemeier pelo tempo e pela disponibilidade de seu profundo conhecimento dedicado à análise estatística, bem como pelas sugestões na elaboração dos artigos. Acima de tudo, agradeço pelo entusiasmo, contagiante, pela pesquisa e seus frutos.

Agradeço a amiga e colega Deise Marcela Piovesan pela fiel parceria neste e em muitos outros trabalhos, na medicina e fora dela também.

Agradeço ao Dr. Moisés Bauer por aceitar envolver o Laboratório de Imunologia do Envelhecimento do IPB-PUCRS neste estudo, pelas idéias, pela motivação e pela disponibilidade. Agradeço ao trabalho incansável e parceria das queridas biomédicas Talita Baptista e Laura Petersen, feito sempre com dedicação e cuidado.

Agradeço aos médicos residentes dos Serviços de Reumatologia da PUCRS e do HNSC e aos colegas reumatologistas de Porto Alegre pelo encaminhamento de pacientes.

Por fim, agradeço aos pacientes que gentilmente se dispuseram a participar desta pesquisa.

*“Você é um entre 6.4 bilhões de indivíduos, pertencente a uma única espécie, entre outras três milhões de espécies classificadas, que vive num planetinha, que gira em torno de uma estrelinha, que é uma entre 100 bilhões de estrelas que compõe uma galáxia, que é uma entre outras 200 bilhões de galáxias num dos universos possíveis e que vai desaparecer. É por isso que todas as vezes na vida que alguém me pergunta: “Você sabe com quem está falando?”, eu respondo: “Você tem tempo?”*

*Mario Sergio Cortella*

## RESUMO

**Introdução.** A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica com envolvimento articular proeminente. O ultrassom de alta resolução (US) tem sido empregado de maneira crescente na avaliação diagnóstica e monitorização da doença. O desequilíbrio entre as funções de linfócitos T regulatórios (Treg) e Th-17, bem como o papel de citocinas pró inflamatórias são centrais em sua patogênese. Há escassez de estudos sobre a associação entre os achados ultrassonográficos de atividade da AR e dano estrutural com subtipos linfocitários e citocinas no sangue periférico. **Métodos:** Neste estudo transversal, foram incluídos 101 pacientes com AR de acordo com os critérios de 1987 em tratamento com drogas remissivas não-biológicas. Uma amostra de sangue foi coletada imediatamente antes das avaliações clínica e ultrassonográfica, que foram feitas todas no mesmo dia, em sequência. Os linfócitos foram isolados e imunofenotipados por citometria de fluxo para identificar células T reg FoxP3+ e linfócitos produtores de IL-17. Citocinas do perfil Th1-Th2-Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF e IFN- $\gamma$ ) e VEGF foram quantificadas no plasma por citometria de fluxo utilizando-se o kit Cytometric Bead Array (CBA; BD biosciences). Atividade da doença foi quantificada por DAS28 e capacidade funcional, pelo HAQ, ambos realizados por reumatologista treinado, cegado em relação aos achados de US. Dois reumatologistas (cegados em relação aos dados clínicos) com treinamento em ultrassonografia realizaram avaliação de sinovite e presença de erosões em punhos, 2ª e 3ª articulações metacarpofalangeanas e 2ª e 3ª interfalangeanas proximais bilateralmente utilizando aparelho de alta resolução (MyLab 60, Esaote, Itália, transdutor linear de 18 MHz). Proliferação sinovial na escala de cinzas (PS) e captação de power Doppler (pD) foram avaliadas utilizando uma escala semi-quantitativa com variação de 0 a 3. Erosões foram classificadas como presentes ou ausentes. A soma dos escores individuais de PS e pD foi calculada (escore 10 PS e escore 10 pD) e utilizada para correlacionar com dados clínicos e de laboratório. Teste de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e coeficiente de correlação de Spearman foram usados na análise estatística, bem como regressão linear múltipla. Correlação intraclasse e estatística *kappa* foram usados para concordância interobservador. **Resultados:** Dentre os 101 pacientes incluídos, obtivemos quantificação de células Treg e Th-17 em 90 pacientes e dosagem de citocinas em 64 indivíduos. Em sua maioria, a amostra foi composta por mulheres (80%) da raça branca (85%), com média de idade de 55,8 anos ( $\pm 11,1$ anos), tempo de duração de doença de 6 (2-13) anos (mediana e IIQ). A média do DAS 28 (VSG)

foi de 4.28 ( $\pm 1.64$ ) e do HAQ 1.11 ( $\pm 0.85$ ). Valores de *kappa* para a concordância interobservador para o exame ultrassonográfico variaram de 0.53 a 1; a correlação intraclasse para o escore 10 PS foi de 0.964 (IC95% 0.899-0.986,  $P < 0.001$ ) e, para o escore 10 pD, 0.859 (IC95% 0.646-0.941,  $P < 0.001$ ). Não houve correlação entre escore 10 PS e escore 10 pD com DAS28 e HAQ. Erosões ósseas foram associadas aos escores 10 PS e pD ( $p=0.002$ ), mas não com DAS 28 ( $P=0,079$ ) e HAQ ( $P=0,057$ ). Observamos correlação entre contagem de articulações edemaciadas com escore 10 PS e escore 10 pD ( $r_s=0.54$ ,  $P < 0.001$  e  $r_s=0.39$ ,  $P < 0.001$ ; respectivamente), bem como associação com a presença de erosões ( $P < 0.001$ ). Não observamos correlação entre contagem de articulações dolorosas com escore 10 GS ( $r_s = -0.071$   $P = 0.524$ ), escore 10 pD ( $r_s = -0.196$   $P = 0.078$ ) ou associação com presença de erosões ( $P=0.248$ ). Não houve correlação significativa de escore 10 PS e pD com Treg ( $r_s=0.122$ ,  $P=0.254$  e  $r_s=0,056$ ,  $P=0.602$ , respectivamente) e Th-17 periféricas ( $r_s=-0.083$ ,  $P=0.438$  e  $r_s=-0.060$ ,  $P=0,575$ , respectivamente). Não se observou associação entre percentual de células Treg e Th-17 e presença de erosões ( $P=0.831$  e  $P=0.632$ , respectivamente). A concentração de IL-6, mas não de outras citocinas, se correlacionou ao DAS28 ( $r_s$  0.31 IC95% 0.07 a 0.52), VSG ( $r_s$  0.43 IC95% 0.19 a 0.62) e contagem de articulações edemaciadas ( $r_s$  0.39 95%CI 0.15 a 0.59), bem como com escore 10 pD ( $r_s$  0.33 IC95% 0.07 a 0.56), captação de pD em punhos direito e esquerdo ( $r_s$  0.34 IC95% 0.11 a 0.54 e  $r_s$  0.45 IC95% 0.21 a 0.64, respectivamente) e PS em punhos direito e esquerdo ( $r_s$  0.40 IC95% 0.20 a 0.59 e  $r_s$  0.35 IC95% 0.08 a 0.57, respectivamente). Utilizando-se modelo de regressão linear múltipla, observou-se que o escore 10 pD foi positivamente associado a IL-6 independente de DAS28 ( $P=0.025$ ). Não houve associação entre nenhuma das citocinas testadas e a presença de erosões ósseas ( $P \geq 0.17$  para todos os testes). **Conclusões:** Em pacientes com AR estabelecida sob uso de remissivos sintéticos, observamos: ausência de associação de escore 10 PS e pD com DAS28 e HAQ; associação entre escore 10 PS e pD e erosões ósseas; associação de contagem de articulações edemaciadas, mas não de articulações dolorosas, com sinovite e erosões no US; ausência de associação entre achados de US e linfócitos Treg e Th-17 no sangue periférico; associação entre IL-6 plasmática e achados de sinovite no US. A associação entre IL-6 e escore pD ocorreu independente do DAS28. **Palavras-chave:** Artrite Reumatoide, ultrassom, power Doppler, Treg, Th-17, citocinas, IL-6.



## ABSTRACT

**Introduction:** Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune, inflammatory and chronic disease. Musculoskeletal ultrasound (MSUS) has been increasingly used for diagnostic evaluation and monitoring of patients. Regulatory T cells (Tregs) and lymphocytes producers of IL 17 (Th17) imbalance and dysfunction, as well as pro inflammatory cytokines, have been implicated in the pathogenesis of RA. There are few studies on the association of circulating lymphocytes subtypes and cytokines with MSUS findings in RA. **Methods:** One hundred and one RA patients (1987 American College of Rheumatology criteria) treated with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) were included in this cross sectional study. A blood sample was taken just before clinical and ultrasonographic evaluation, which were all performed on the same day, consecutively and in a blinded fashion. Lymphocytes were isolated and immunophenotyped by flow cytometry to investigate regulatory FoxP3<sup>+</sup> T cells and IL-17<sup>+</sup> cells. Plasma Th1-Th2-Th17 cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF e IFN- $\gamma$ ) and VEGF were searched using a Cytometric Bead Array (CBA; BD biosciences) kit by flow cytometry. Disease activity and disability were measured using Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) and Health Assessment Questionnaire (HAQ). MSUS (MyLab 60, Esaote, Genova, Italy, 18 MHz linear probe) was performed consecutively by two ultrasound-trained rheumatologists on the wrists, 2<sup>th</sup> and 3<sup>th</sup> metacarpophalangeal and 2<sup>th</sup> and 3<sup>th</sup> proximal interphalangeal joints of both hands. Gray-scale synovial hypertrophy (PS) and power Doppler signal (pD) were searched using a semi-quantitative scale (0-3). Erosions were classified as present or absent. The sum of the individual joint scores for PS and pD (10-joint PS and pD scores) was calculated and used to correlate with clinical and laboratory data. Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test and Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ) were used for statistical analysis, as well as liner multivariate regression. Interater agreement was tested using *kappa* statistics and intraclass correlation. **Results:** Among 101 patients, we were able to measure Treg/Th-17 in 90 individuals. Plasma cytokines were searched in 64 patients. Clinical and demographic features were: mean age, 55.8  $\pm$  11 years; female gender, 80%; Caucasians, 85%; median (interquartile range) disease duration 6 (2-13) years; mean  $\pm$  SD DAS28, 4.28  $\pm$  1.64; mean  $\pm$  SD HAQ score, 1.11  $\pm$  0.85. Interobserver agreement (*kappa*) for US features varied from 0.53 to 1.0. Intraclass correlation for 10-joint PS score was 0.964 (95% CI 0.899-0.986, P <0.000) and for 10-joint pD score was 0,859 (95% CI 0.646-0.941, P

<0.001). There was no significant correlation of 10-joint PS and pD scores with DAS28 and HAQ score. The presence of bone erosions was associated with 10-joint PS and pD scores ( $p=0.002$ ), but not with DAS 28 ( $p=0.079$ ) or HAQ ( $0.057$ ). Swollen joint count, but not tender joint count, was correlated with 10-joint PS and pD scores ( $r_s=0.54$ ,  $P<0.001$  and  $r_s=0.39$ ,  $P<0.001$ ; respectively), as well as associated with bone erosions ( $P<0.001$ ). There was no significant correlation of with 10-joint PS and pD scores with peripheral Tregs ( $r_s=0.122$ ,  $P=0.254$  and  $r_s=0.056$ ,  $P=0.602$ ) and Th17 cells ( $r_s=-0.083$ ,  $P=0.438$  and  $r_s=-0.060$ ,  $P=0.575$ ). Tregs and Th17 cells were not associated with erosions ( $p=0.831$  and  $p=0.632$ , respectively). Among all tested cytokines, IL-6 was correlated with DAS28 ( $r_s$  0.31 IC95% 0.07 to 0.52), erythrocyte sedimentation rate ( $r_s$  0.43 IC95% 0.19 to 0.62) and swollen joint count ( $r_s$  0.39 95% CI 0.15 a 0.59). IL-6 was also correlated with 10-joint pD score ( $r_s$  0.33 IC95% 0.07 to 0.56), right and left wrists pD ( $r_s$  0.34 IC95% 0.11 to 0.54 and  $r_s$  0.45 IC95% 0.21 to 0.64), and right and left PS ( $r_s$  0.40 IC95% 0.20 to 0.59 and  $r_s$  0.35 IC95% 0.08 to 0.57). Using multivariate linear regression model, 10-joint pD score was positively associated with IL-6 independently of DAS28 ( $P=0.025$ ). There was no association of any of the tested cytokines with bone erosions ( $P\geq 0.17$  for all tests). **Conclusions:** In established RA patients, treated with non biological DMARDs, we observed the following: lack of correlation of 10-joint PS and pD scores and DAS28 and HAQ; positive association of 10-joint PS and pD scores with bone erosions; positive association of swollen joint count, but not tender joint count, with MSUS synovitis and erosions; lack of correlation of MSUS features and circulating Treg and Th-17 cells; positive correlation of plasma IL-6 and MSUS synovitis. The association of IL-6 with 10-joint pD score was independent of DAS28.

**Keywords:** Rheumatoid Arthritis, ultrasound, power Doppler, Treg, Th-17, cytokines, IL-6.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Associação entre escore 10 PS e presença de erosões .....	44
Figura 2 - Associação entre escore 10 pD e presença de erosões.....	44
Figura 3 - Associação do número de articulações edemaciadas com escore 10 PS .....	45
Figura 4 - Associação do número de articulações edemaciadas com escore 10 pD.....	46
Figura 5 - Associação do número de articulações edemaciadas com erosões ósseas. ...	46
Figura 6 - Associação entre percentual de células Treg e nível de atividade da doença pelo DAS28 .....	49
Figura 7 - Correlação de DAS28 com IL-6 .....	57
Figura 8 - Correlação de escore 10 pD com IL-6 .....	57

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Características da população.....	41
Tabela 2 – Número de pacientes por categoria de DAS28.....	41
Tabela 3 – Valores de <i>kappa</i> para cada sítio de aquisição de imagens e alteração ultrassonográfica específica.....	42
Tabela 4 – Coeficientes de correlação entre os escores ultrassonográficos e medidas de avaliação clínica .....	43
Tabela 5 – Coeficientes de correlação entre subpopulações linfocitárias e escores ultrassonográficos, DAS28 e contagem de articulações dolorosas e edemaciadas .....	48
Tabela 6 – Características dos pacientes testados para citocinas e controles.....	51
Tabela 7 – Comparação dos níveis de citocinas plasmáticas entre pacientes e controles .....	52
Tabela 8 – Correlação entre citocinas nos pacientes com AR.....	53
Tabela 9 – Correlação entre todas as citocinas testadas nos pacientes com AR e parâmetros clínicos.....	55
Tabela 10 – Correlação entre todas as citocinas testadas nos pacientes com AR e parâmetros ultrassonográficos .....	56
Tabela 11 – Modelo de regressão linear múltipla sendo IL-6 a variável dependente ....	58
Tabela 12 – Modelo de regressão linear múltipla sendo IL-6 a variável dependente após remoção de 6 casos identificados como <i>outliers</i> .....	58

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
1.1	Artrite Reumatoide .....	14
1.1.1	Diagnóstico .....	15
1.1.2	Índices Compostos de Atividade da Doença .....	17
1.1.3	Avaliação da capacidade funcional .....	19
1.1.4	Tratamento .....	20
1.2	Citocinas e subtipos linfocitários na artrite reumatoide .....	21
1.3	O uso do ultrassom de alta resolução na artrite reumatoide .....	24
1.3.1	Escores ultrassonográficos na artrite reumatoide.....	27
1.4	Achados de US e citocinas/linfócitos.....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	HIPÓTESES.....	30
4	OBJETIVOS.....	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
5.1	Delineamento .....	32
5.2	População do Estudo .....	32
5.3	Avaliação Clínica.....	33
5.4	Citocinas e subtipos linfocitários.....	33
5.5	Avaliação Ultrassonográfica.....	35
5.6	Cálculo do tamanho da amostra .....	37
5.7	Aspectos Éticos.....	37
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
7	resultados .....	40
7.1	Características da população em estudo .....	40
7.2	Concordância interobservador para o exame ultrassonográfico.....	42
7.3	Correlação entre achados ultrassonográficos e clínicos.....	43
7.4	Achados ultrassonográficos, clínicos e linfócitos Treg e Th-17 .....	47
7.5	Achados ultrassonográficos, clínicos e citocinas .....	50
8	DISCUSSÃO.....	59
9	CONCLUSÕES .....	67
10	PERSPECTIVAS .....	69
11	FINANCIAMENTO .....	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
	ANEXOS.....	82
	Anexo A - Termo de Aprovação do Comitê Científico .....	82
	Anexo B - Termo de Aprovação do Comitê de Ética e Registro Plataforma Brasil... 84	
	Anexo C – Artigo submetido e aceito para publicação com dados parciais do projeto com carta de confirmação do aceite e artigo em inglês.....	86
	Anexo D - Comprovante de Submissão e artigo principal em inglês.....	92
	Anexo E– Critérios para Classificação de Artrite Reumatoide Segundo o Colégio Americano de Reumatologia - 1987 - (ACR 1987).....	103
	Anexo F– Critérios para Classificação de Artrite Reumatoide do Colégio Americano de Reumatologia/Liga Europeia Contra o Reumatismo(Critérios ACR/EULAR 2010) .	104
	Anexo G – Escore de Atividade de Doença com Vinte e Oito Articulações.....	105
	Anexo H – <i>Health Assessment Questionnaire</i> - HAQ.....	106
	APÊNDICE A –Exemplos de imagens ultrassonográficas obtidas .....	108
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	110
	APÊNDICE C–Protocolo de coleta de dados clínicos.....	113

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica, crônica, inflamatória, autoimune, que compromete as articulações – em especial pequenas articulações das mãos e punhos - tendo como característica a formação de erosões ósseas e, conseqüentemente, deformidades (1). A prevalência mundial da doença varia de 0,5 a 1% dos adultos, predominando em mulheres de meia idade (2,3) , e está associada a um aumento da mortalidade, especialmente por complicações cardiovasculares secundárias a inflamação crônica (2,4). Além da maior incidência de eventos cardiovasculares, os portadores de AR sofrem com a história natural de desenvolvimento de deformidades articulares e conseqüente limitação funcional – com dificuldades na execução de atividades de vida diária e laboral - e diminuição da qualidade de vida (5,6).

A etiologia da AR ainda não é completamente conhecida e totalmente elucidada, embora haja evidências de que fatores genéticos, imunológicos e ambientais estejam envolvidos (1). A principal característica da doença é a formação do *pannus* articular a partir da proliferação da membrana sinovial cronicamente inflamada, configurando um tecido altamente neovascularizado e rico em células e citocinas, com capacidade de destruir a articulação. Tais propriedades patológicas serão responsáveis pelas manifestações clínicas e radiológicas (7).

### 1.1.1 Diagnóstico

O diagnóstico de AR tradicionalmente fora baseado em critérios clínicos, laboratoriais e radiográficos propostos em 1987 sendo necessário a presença de 4 itens para o diagnóstico e com duração dos sintomas de pelo menos 6 semanas. Tais critérios incluíam a presença de rigidez matinal superior a 1 hora, edema de pelo menos três articulações, edema de pequenas articulações das mãos ou punhos, artrite simétrica, nódulos reumatoides, fator reumatoide (FR) positivo, erosões ou rarefação óssea justarticular em raio X das mãos e punhos (8). Esses critérios foram baseados na análise de 262 pacientes com média de 7.7 anos de duração de doença, comparados a pacientes com outras doenças reumáticas e conseguem caracterizar adequadamente o paciente com doença estabelecida, de longa data e sem resposta ao (ou sem instituição de) tratamento modificador da doença, com sensibilidade de 91% e especificidade de 89%.

Claramente, pacientes com doença inicial não são englobados nos critérios de 1987. Somado a isso, a identificação e disponibilização comercial de um novo anticorpo com maior especificidade do que o FR, e que surge na fase pré-clínica da doença, o anticorpo anti peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) (9–11), bem como o desenvolvimento de novas tecnologias de imagem para visualização de erosões ósseas, sinovite e tenossinovite – ultrassonografia de alta resolução (US) e ressonância magnética (RNM), tornaram necessária a revisão e atualização diagnósticas da AR. Em 2010, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) propuseram novos critérios classificatórios com a ideia de discriminar, entre os pacientes que se apresentam com sinovite inflamatória indiferenciada, aqueles que estão em maior risco de doença persistente ou erosiva (12). Os critérios foram agrupados em formato de um escore que pode ser aplicado a qualquer paciente que apresente, pelo menos, uma articulação com artrite clínica no momento da avaliação e cuja artrite não

possa ser explicada por diagnóstico alternativo. O escore é composto por quatro domínios, pontuados, que incluem a observação de envolvimento articular (dor e/ou edema ao exame físico ou por método de imagem) em pequenas ou grandes articulações (pontuação de 0 a 5); presença de FR e/ou anti-CCP (pontuação de 0 a 3); alteração em provas inflamatórias – velocidade de hemossedimentação (VSG) e/ou proteína C reativa (PCR) (pontuação de 0 a 1); duração dos sintomas maior ou menor de 6 semanas (pontuação de 0 a 1). A pontuação máxima é de 10 pontos e são considerados com AR definida pacientes que atingirem 6 ou mais pontos no escore. Essa nova proposta de critérios classificatórios foca no estágio inicial da AR, possibilitando o diagnóstico precoce e instituição de tratamento que previna as complicações da doença estabelecida.



### 1.1.2 Índices Compostos de Atividade da Doença

Atualmente, sabe-se que o controle estrito da atividade inflamatória deve ser alvo para todos os portadores de AR, sendo a mudança da estratégia terapêutica baseada em medidas clínicas objetivas, e feita em consultas frequentes com o especialista (13). Recomenda-se o uso de instrumentos validados, conhecidos como Índices Compostos de Atividade da Doença (ICAD), e progressão do tratamento de acordo com a avaliação do especialista aliado ao resultado do ICAD.

Os ICAD mais utilizados são o DAS28 (score de atividade de doença de 28 articulações), o SDAI (índice simplificado de atividade de doença) e o CDAI (índice clínico de atividade de doença), que usam combinações de medidas objetivas (contagem de articulações edemaciadas, valor de velocidade de hemossedimentação ou proteína C reativa) e de medidas subjetivas (contagem de articulações dolorosas e avaliação global da atividade da doença pelo paciente e pelo médico) para avaliar o grau de atividade da doença (13).

De acordo com o ICAD, que pode ser escolhido pela preferência do reumatologista assistente, e deve ser usado no acompanhamento longitudinal do paciente, a atividade da doença é categorizada em remissão, atividade baixa, moderada ou alta.

Dentre estes instrumentos, o DAS 28 é o mais amplamente empregado, sendo uma escala contínua e com distribuição normal, Gaussiana, na população com AR. Está baseado no número de articulações dolorosas e edemaciadas de um total de 28 articulações (ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e joelhos, excluindo pés e tornozelos), na avaliação global da doença através de uma escala analógica visual (EVA) de 0 a 100mm, e na avaliação laboratorial de atividade inflamatória pela velocidade de hemossedimentação (VSG) (14).

O valor do DAS 28 resulta de um cálculo cuja fórmula é:  $0.56 * \text{raiz quadrada}(\text{dolorosas28}) + 0.28 * \text{raiz quadrada}(\text{edemaciadas28}) + 0.70 * \log(\text{VSG}) + 0.014 * \text{EVA}$ . Considera-se remissão da AR quando a pontuação do DAS 28 é inferior a 2,6, baixa atividade de 2,6 a 3,2 pontos, atividade moderada de 3,2 a 5,1 e atividade intensa acima de 5,1 pontos, sendo 10 a pontuação máxima do índice. Modificações no DAS28 de 1,2 são consideradas clinicamente relevantes (15).

### 1.1.3 Avaliação da capacidade funcional

A incapacidade é um desfecho relevante e sempre estudado em AR. Resulta da dor, inflamação e destruição articular, desenvolvendo-se ao longo do tempo e podendo – ou não - regredir. Para avaliação da capacidade funcional, ou do grau de incapacidade, utiliza-se como instrumento o questionário HAQ (*Health Assessment Questionnaire*), autoaplicável, validado para a língua portuguesa (16), com 20 questões divididas em oito componentes representando atividades da vida diária (vestir-se e arrumar-se, levantar-se, alimentar-se, caminhar, higiene, alcançar objetos, preensão e desempenho de atividade). Valores de HAQ entre 0 e 1 indicam limitação leve; maior de 1 até 2 indicam limitação moderada; e maiores de 2 até 3, limitação grave (17). Recomenda-se utilizar o HAQ na assistência aos pacientes na avaliação inicial e também em consultas subsequentes, sendo esperada a redução mínima de 0.22 pontos ao final do primeiro ano de acompanhamento (13).

#### 1.1.4 Tratamento

O tratamento farmacológico da AR envolve a utilização de drogas com ação no sistema imune, de maneira escalonada, rápida, e em doses e associações adequadas com objetivo de controle da atividade inflamatória a partir do momento em que há o diagnóstico da doença (13).

Os medicamentos centrais no manejo da AR são divididos em drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas - metotrexate, hidroxicloroquina, difosfato de cloroquina, sulfassalazina e leflunomide - e DMCD biológicas. As DMCD biológicas agem de maneira imune específica, e estão aprovados para uso no Brasil atualmente: agentes anti-TNF (adalimumabe, certolizumabe, etanercepte, infliximabe e golimumabe), bloqueador da coestimulação do linfócito T (abatacepte), depletor de linfócito B (rituximabe) e bloqueador do receptor da interleucina 6 (tocilizumabe) (13). Recentemente, também foi aprovado para uso no Brasil outra DMCD sintética, mas alvo-específica, inibidor seletivo das Janus quinases (JAK) que surge como outra opção terapêutica em pacientes selecionados (18).

Com o tratamento, objetiva-se atingir estado de remissão ou baixa atividade inflamatória definido pelo ICAD. O tratamento deve ser otimizado (doses ajustadas ou associação de DMCD sintéticas entre si ou associação de DMCD sintéticas com biológicas) de acordo com a pontuação no ICAD escolhido para acompanhamento do paciente, em cada consulta, sistematicamente. A estratégia de manter um alvo terapêutico de, no mínimo, estado de baixa atividade inflamatória é denominada tratamento por metas e é comprovadamente eficaz reduzindo, portanto, progressão da doença, dano estrutural e incapacidades quando comparado ao manejo convencional da AR (19,20).

## 1.2 Citocinas e subtipos linfocitários na artrite reumatoide

A complexa fisiopatogênese da AR envolve, entre outros aspectos, a inter-relação entre células do sistema imune inato e adaptativo através da produção de citocinas de forma autócrina (ação sobre as células que as produziram) ou parácrina (ação sobre células próximas) (21). As citocinas são pequenas proteínas com papel fundamental na sinalização celular, e que estimulam a proliferação, apoptose, diferenciação e ativação celulares com ações que podem ser sinérgicas e/ou redundantes (21). São, classicamente, divididas em pró e anti-inflamatórias ou supressoras.

São consideradas citocinas pró inflamatórias o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-17 (IL-17) e ligante do receptor do fator nuclear kappa-B (RANKL). São consideradas citocinas supressoras interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10).

Recentemente, diversas novas citocinas (interleucina-7, interleucina-15, interleucina-18, interleucina-21) e fatores de crescimento – entre eles o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) - foram identificados e implicados na patogênese da AR (21,22). As citocinas atuam integrando a ativação imune patológica da AR em suas diversas fases (pré clínica, precoce, estabelecida). No entanto, apesar do grande número e de funções ora distintas, ora sobrepostas das citocinas, acredita-se haver uma posição hierárquica nesta trama, ocupada em especial pelo TNF e IL-6, e corroborada pela evidência inequívoca de benefício clínico com seu antagonismo (23,24).

Talvez a via mais estudada de gatilho para o desenvolvimento clínico da AR seja a de ativação de linfócitos T nos tecidos sinoviais. Esses linfócitos, ao serem ativados por moléculas antigênicas do complexo HLADR, apresentados por macrófagos, linfócitos B ou sinoviócitos, se diferenciam em linfócitos auto reativos Th-1 e Th-17. A partir desta diferenciação, secretam TNF, IL-1, IL-6, IL-17 e RANKL que estimulam a perpetuação

do processo inflamatório através de ativação, migração e adesão leucocitária, ativação endotelial e angiogênese, ativação de condrócitos, expressão de outras citocinas, ativação de osteoclastos, e supressão da atividade das células T regulatórias (22,23,25,26). Também estão envolvidas na perpetuação do processo inflamatório da AR citocinas como interferon gama (IFN  $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2). Outras citocinas tentam controlar a destruição óssea, promovendo efeito osteoblastogênico, como a interleucina-4 (IL-4) e exercendo papel supressor sobre os linfócitos ativados, como IL-10 (22,23).

Acredita-se que a quebra da auto tolerância imunológica, associada a um fator ambiental ainda desconhecido, seja o mecanismo inicial que leva à resposta imune aberrante, desregulada, aos auto antígenos com perda da homeostase tecidual (23,27).

A regulação imune ocorre através da ação de uma subpopulação de linfócitos T com propriedades supressoras/regulatórias associadas à manutenção da tolerância antígeno-específica, com capacidade *in vitro* de inibir ativamente a proliferação e função de outras células T: as células T regulatórias (Treg) (28). As células Treg expressam fator de transcrição Foxp3, e altos níveis de CD25 (receptor de IL-2)(29), CTLA-4 (antígeno associado ao linfócito citotóxico) (30) e receptor de fator de necrose tumoral induzido por corticoide (GITR) (31), além de alta expressão de CD95 e, em humanos, baixa expressão de CD45RB e CD127 (32,33). Tais marcadores servem para identificação das células Treg. Classicamente, Treg conseguem suprimir linfócitos CD4+ e CD8+, mas também são capazes de suprimir a atividade de células B, células assassinas naturais (*natural killer cells*), células dendríticas e outras células apresentadoras de antígenos. O mecanismo exato de atuação das Treg ainda é desconhecido, mas acredita-se que envolva contato célula a célula através de receptores de membrana e secreção de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (27).

As células Treg têm uma relação próxima, embora antagônica, com outro

subtipo linfocitário recentemente descrito, o linfócito Th-17, que expressa o fator de transcrição receptor nuclear C órfão relacionado ao receptor de ácido retinóico (RORC) e secreta a citocina pró inflamatória IL-17 (34). A partir de um linfócito T *náive*, na dependência de TGF- $\beta$ , e na presença de IL-1 e IL-6, ocorre a diferenciação para Th-17. Na presença isolada de TGF- $\beta$ , sem IL-1 e IL-6, o linfócito T *náive* se diferencia em Treg. Os linfócitos Treg mantêm sua ação supressora, enquanto Th-17 age de maneira pró inflamatória através da produção de IL-17. Observa-se que pacientes com AR ativa apresentam número aumentado de Th-17 e baixo de Treg comparado a controles saudáveis (35,36), embora haja resultados controversos em relação à quantidade das Treg em AR. Em portadores desta enfermidade, acredita-se haver um desequilíbrio entre Th-17 e Treg, sendo Th-17 resistente a supressão pelas células Treg (37), contribuindo para a resposta patogênica a auto-antígenos.

Existem diversas publicações sobre células Treg em AR que evidenciam conclusões variadas: alguns estudos relatam proporções diminuídas (38–40), normais (41) ou aumento no nível circulante de linfócitos Treg (42–44). Dentro da articulação inflamada, no entanto, sabe-se que há um aumento no número de linfócitos Treg (45), o que sugere haver, de fato, uma alteração na *função* dessas células, ou seja, uma alteração qualitativa e não quantitativa de linfócitos Treg, quando inseridos no ambiente sinovial inflamatório, impedindo sua ação regulatória (26,38,39,46–49).

### 1.3 O uso do ultrassom de alta resolução na artrite reumatoide

A radiografia convencional é a maneira habitual de avaliar e monitorar o dano articular nos pacientes com AR. No entanto, não é possível, pela radiografia, avaliar o processo inflamatório articular que envolve estruturas não ósseas. O US, por outro lado, têm demonstrado ser uma técnica confiável e reproduzível, inclusive em nosso meio (50), estando presente nas recomendações internacionais de uso de métodos de imagem na avaliação e acompanhamento de pacientes com AR (51) e também em recomendações de especialistas (52).

Além do diagnóstico de doença erosiva (53–55), achados recentes em estudos de US justificam um amplo espectro de indicações em sujeitos com AR, principalmente na avaliação da sinovite articular e seguimento da atividade inflamatória pelo sinal de *power* Doppler (pD), que consegue identificar microvasos (neoangiogênese) na sinóvia inflamada (56–59).

Há diversas evidências de que o US é mais sensível do que o exame físico para a detecção de artrite (60–65). Ainda, sabe-se da utilidade do US na avaliação objetiva do grau de atividade inflamatória (62,66), seja através da detecção de sinovite subclínica (67–69), predição de dano estrutural com a persistência de captação de pD intrarticular (70–72), predição de piora clínica - inclusive em pacientes em remissão candidatos a redução da terapia com DMCD biológicas -(73–75) e, conseqüentemente, auxílio no manejo terapêutico (75–78).

Gartner e colaboradores demonstraram captação de sinal de pD em até 20% dos pacientes em remissão pelo DAS28, e associação de maior grau de captação de sinal de pD com piores escores no HAQ (69). Especialmente nesses pacientes em remissão



clínica, a relação entre persistência de captação de pD com piora clínica (*flare*) está bem estabelecida, com odds ratio de 3.2 [(95% CI 1.8, 5.9), P = 0.0001,  $I^2 = 0\%$ ] demonstrado em metanálise (79).

Novamente, Gärtner e colegas fizeram avaliação por US de articulações clinicamente sem edema em 90 pacientes com AR em remissão e verificaram, de maneira retrospectiva, qual o período de inatividade da referida articulação. Foi observado que articulações com baixa atividade de pD tinham tempo médio desde o último episódio de edema articular clínico mais longo, sugerindo que a atividade ultrassonográfica subclínica possa atenuar ao longo do tempo (80).

Em estudo utilizando o US como complemento ao DAS 28 envolvendo pacientes com AR inicial, observou-se que, em 30% dos casos, os achados no US foram contraditórios ao DAS 28 e levaram a modificação de decisão terapêutica, seja ela adicionar ou diminuir a imunossupressão (81).

Em pacientes sem diagnóstico reumatológico definido e sintomas articulares inflamatórios de menos de 12 meses de duração, referenciados para clínica de AR inicial por clínicos gerais, o ultrassom aumentou a certeza do reumatologista em diagnosticar a presença ou ausência de artrite inflamatória (33% pré teste e 71.8% pós teste), bem como de AR (31% pré teste e 61% pós teste) de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0.001$  para ambas as condições) (82).

Em pacientes com AR estabelecida, o exame ultrassonográfico de punhos e metacarpofalangeanas aumentou a confiança do médico assistente em sua decisão clínica, independentemente do DAS 28, e aumentou a confiança do paciente na decisão do médico (83).

O quanto o US efetivamente contribui no manejo de pacientes com AR – seja doença estabelecida ou doença inicial- ainda não é uma questão totalmente elucidada. Recentemente, os resultados do estudo *ARTIC TRIAL* foram apresentados, onde se comparou, após randomização de 238 pacientes, a estratégia de tratamento intensiva em pacientes com AR inicial (pacientes com menos de dois anos de doença e ainda sem tratamento) com e sem a adição do exame ultrassográfico durante 24 meses (objetivando DAS28 < 1.6 e/ou nenhuma articulação com captação de power Doppler) (84). Este estudo não encontrou diferença entre as duas estratégias na probabilidade de atingir remissão clínica sustentada e na progressão radiográfica. Ambas as abordagens demonstraram melhora sustentada nos desfechos clínicos e mínima progressão radiográfica neste grupo de pacientes.

Há outros dois ensaios clínicos em andamento para quantificar o impacto desta tecnologia no manejo global da doença (Registro americano de ensaios clínicos: NCT02140229 *Is Ultrasound Remission a Real Remission? Does Ultrasound Permit to Achieve and Maintain the Remission in Rheumatoid Arthritis Patients More Efficiently Than Clinical Scores? (REVECHO)*; NCT02410304 *Pragmatic Study Comparing the Clinical Evaluation Methods and / or Ultrasound Method in Rheumatoid Arthritis to Adapt Treatment*), sendo, portanto, um assunto ainda em debate.

Acredita-se, mesmo frente ao resultado do *ARTIC TRIAL*, que a incorporação do US no manejo da AR seja benéfica, com vistas à redução de custos, otimização de tratamento e, possivelmente, à melhor adesão e compreensão dos pacientes em relação à sua enfermidade. Ainda, essa incorporação pode ter desfechos diversos quando o US é inserido no contexto clínico da assistência a pacientes com AR estabelecida *versus* AR inicial.

### 1.3.1 Escores ultrassonográficos na artrite reumatoide

Atualmente, não existe conformidade sobre quais articulações devam ser avaliadas por ultrassonografia de maneira sistemática para pesquisar inflamação em AR. Foram sugeridos diversos escores ultrassonográficos para avaliação de sinovite, mas o conjunto ideal de sítios para exame ainda não foi completamente definido na literatura, sendo questão constante de discussão.

Em revisão sistemática publicada em 2011 (85), onde todos os escores publicados até aquela ocasião foram analisados quanto a responsividade, confiabilidade e factibilidade, concluiu-se que ainda não havia consenso sobre o tema, sendo uma tarefa desafiadora definir o número mínimo de articulações a ser incluído em um escore global e que represente, realmente, a atividade inflamatória no paciente como um todo.

Dentre os escores disponíveis, o mais utilizado nos trabalhos científicos até o momento é o proposto por Backhaus e colaboradores, que desenvolveram o escore 7 (*7-joint score* - composto por 5 articulações da mão e 2 articulações do pé do lado dominante) para sumarizar os achados ultrassonográficos na prática clínica. O escore 7 conseguiu refletir atividade da doença e resposta ao tratamento, e foi o primeiro escore a descrever alterações erosivas e inflamatórias, demonstrando coeficientes de correlação com DAS 28 que variaram de 0.31 a 0.44 (86,87). No entanto, estudos recentes continuam enfocando a busca por um escore ideal, havendo novas propostas na literatura (88–91), inclusive com inclusão da avaliação bilateral do tendão extensor ulnar do carpo, além das tradicionais pequenas articulações das mãos, carpo e pequenas articulações dos pés (90).

#### 1.4 Achados de US e citocinas/linfócitos

A pesquisa envolvendo achados ultrassonográficos articulares em pacientes com AR com citocinas plasmáticas, teciduais ou em líquido sinovial é recente e ainda pouco explorada.

Em indivíduos saudáveis ( $n = 30$ ), pesquisou-se a correlação de achados ultrassonográficos de proliferação sinovial pela escala de cinzas e captação de sinal de power Doppler (presentes em uma minoria de pessoas hípidas) em articulações periféricas que compõe o DAS 28, com citocinas pró inflamatórias. Observou-se correlação de captação de sinal de power Doppler com fator de crescimento endotelial vascular – VEGF ( $r = 0.395$ ,  $P = 0.046$ ) (92). Não se observou correlação de achados ultrassonográficos com demais citocinas testadas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) no sangue periférico desses indivíduos sem doença.

Ao avaliar 55 pacientes com AR em remissão clínica, por outro lado, observou-se, naqueles pacientes que apresentavam sinovite ultrassonográfica, correlação da captação de power Doppler com elevação de mediadores séricos de angiogênese (VEGF entre eles) mas não de citocinas pró inflamatórias (93).

Ainda, um estudo incorporando o US articular na avaliação da AR e pesquisa de citocinas pró-inflamatórias na sinóvia evidenciou ligação entre a presença de linfócitos Th-17 no líquido sinovial e presença de sinal de *power* Doppler (pD) persistentemente positivo (94). Recentemente, em pacientes com AR estabelecida, a correlação entre IL-17 sérica e a presença de hipertrofia sinovial e captação de *power* Doppler no US de articulações das mãos foi demonstrada ( $r_s = 0.433$ ;  $P = 0.007$  e  $r_s = 0.433$ ;  $P = 0.000$ ) (95).

Há, também, estudos recentes que associam IL-6 plasmática com sinovite ultrassonográfica em pacientes com AR inicial (96) e em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico (97).

## 2 JUSTIFICATIVA

Na última década, o uso do ultrassom de alta resolução como extensão do exame físico conquistou espaço importante na prática reumatológica, sendo útil no diagnóstico e monitorização do tratamento de patologias articulares inflamatórias, entre elas, a AR.

O ultrassom de alta resolução traz informações que indicam inflamação articular através da visualização de proliferação sinovial em escala de cinzas e da captação de sinal de *power* Doppler na área da proliferação da sinóvia, além de identificar dano estrutural ósseo pela visualização da interrupção da cortical óssea, configurando erosão.

A relação de achados ultrassonográficos que avaliam inflamação e dano articular com níveis séricos de citocinas inflamatórias e de células T regulatórias e Th-17 na AR estabelecida ainda não foi completamente explorada no meio acadêmico, o que justifica o corrente estudo.

### 3 HIPÓTESES

**H0:** Não há correlação entre achados ultrassonográficos articulares e índices de atividade clínica, subtipos linfocitários e citocinas circulantes em pacientes com AR.

**H1:** Há correlação entre achados ultrassonográficos articulares e índices de atividade clínica, subtipos linfocitários e citocinas circulantes em pacientes com AR.

## 4 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Avaliar parâmetros inflamatórios e dano estrutural ósseo utilizando ultrassonografia musculoesquelética de alta resolução; correlacionar estes achados com atividade clínica, subtipos linfocitários e citocinas circulantes em pacientes com AR.

### Objetivos específicos

1. Correlacionar o grau de proliferação sinovial, captação de sinal de *power* Doppler e presença de erosões no exame ultrassonográfico de alta resolução com escore clínico de atividade da doença *Disease Activity Score 28 joints* (DAS 28) e questionário de avaliação de limitação funcional *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) em pacientes com AR.
2. Correlacionar os parâmetros ultrassonográficos com percentual de células T regulatórias e Th-17 circulantes em pacientes com AR.
3. Correlacionar os parâmetros ultrassonográficos com níveis séricos de IL2, IL4, IL6, IL10, IL17, TNF, IFN  $\gamma$  e VEGF em pacientes com AR.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento

Estudo observacional transversal.

### 5.2 População do Estudo

Os pacientes foram avaliados no ambulatório de AR do Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS no período de novembro de 2013 a maio de 2015 e incluídos de maneira consecutiva no protocolo após consentirem através do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e preencherem as características descritas abaixo. Critérios de Inclusão:

1. Diagnóstico de AR de acordo com o ACR (1987).
2. Concordância em participar do estudo e assinatura do TCLE.
3. Tratamento da AR com DMCD sintéticas (metotrexate, hidroxicloroquina, sulfassalazina e leflunomide) isolados ou em qualquer combinação.
4. Sujeitos de ambos os sexos, com idade a partir de 18 anos.

Critérios de exclusão:

1. Tratamento com drogas biológicas associadas aos DMCD sintéticas ou em uso isolado.
2. Deformidades graves em mãos que dificultem a avaliação ultrassonográfica das estruturas articulares.

Avaliação clínica, exame ultrassonográfico e coleta de amostra de sangue foram



realizadas durante a visita ao ambulatório, em sequência, todas no mesmo dia.

### **5.3 Avaliação Clínica**

Foi realizada a contagem articular, com cálculo do escore DAS28 (98,99) e aplicação do questionário de avaliação capacidade funcional (HAQ) (100) por reumatologista treinado, cegado em relação aos resultados do exame de US. Dados demográficos, clínicos e de tratamento em uso foram coletados dos prontuários dos pacientes.

### **5.4 Citocinas e subtipos linfocitários**

Coleta de sangue periférico, separação do plasma e células mononucleares do sangue periférico:

Foram coletados 20 ml de sangue periférico em tubos de 4ml contendo anticoagulante EDTA. O plasma foi extraído por centrifugação por 10 minutos a 1800 rotações por minuto (RPM). As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por gradiente de centrifugação (Ficoll Histopaque). Posteriormente as PBMCs foram contadas por microscopia eletrônica (100x) e a viabilidade celular foi avaliada através do método de azul tripan (Sigma).

Dosagem de Citocinas e Imunofenotipagem:

As interleucinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF e IFN- $\gamma$  e VEGF foram quantificadas no plasma (congelado a -80oC) por citometria de fluxo utilizando-se o Kit Cytometric Bead Array (CBA; BD biosciences) de acordo com as instruções do

fabricante. Para a análise das citocinas plasmáticas foi utilizado o software FCAP array (BD Bioscience), e os resultados foram expressos em pg/ml.

Para a pesquisa de células Treg e de células T CD4 produtoras de IL-17, a quantidade de  $1 \times 10^6$  PBMCs foram estimuladas com phorbol-ester (PMA; Sigma-Aldrich) e ionomicina (Sigma-Aldrich) e colocadas em cultura a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 horas. Após, as células foram imediatamente permeabilizadas e coradas de acordo com as instruções do fabricante do kit utilizado (Human Th-17/Treg Phenotyping Kit; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). As células foram adquiridas por citometria de fluxo (BD FACS Canto II), onde um mínimo de 50.000 linfócitos foram imunofenotipados por tamanho e granulosidade. Os resultados foram expressos em percentuais de células Th-17 e Treg. A sensibilidade e desempenho geral do citômetro foram verificados e garantidos através do Cytometer Setup e Tracking beads (BD Biosciences) antes da aquisição das amostras. Os dados foram analisados pelo software FlowJo V10 (TreeStar US, Ashland, OR).

As dosagens citadas acima foram efetuadas também em grupo de controles, composto por voluntários saudáveis provenientes da comunidade, pareados por sexo e faixa etária em relação aos casos portadores de AR.

Os testes foram realizados no laboratório de Imunologia e Envelhecimento do Instituto de Pesquisas Biológicas da PUCRS.

## 5.5 Avaliação Ultrassonográfica

O exame ultrassonográfico de pequenas articulações com equipamento de alta resolução modelo My Lab 60 (ESAOTE, Gênova, Itália), pertencente ao Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, com transdutor linear de alta frequência (18 MHz) foi realizado por dois reumatologistas com treinamento em ultrassonografia reumatológica, imediatamente após a avaliação clínica (exame físico articular). Exemplos das imagens obtidas estão no apêndice A. Ambos reumatologistas eram cegados em relação às avaliações clínica, laboratorial e tratamento dos pacientes e também entre si. A avaliação ultrassonográfica foi feita pelo reumatologista 1 e, em seguida, pelo reumatologista 2, seguindo o mesmo protocolo de obtenção de imagens, usando o mesmo aparelho. Os parâmetros de aquisição das imagens na busca de captação de sinal de power Doppler foram os seguintes: frequência para power Doppler de 10 a 12 MHz, com frequência de repetição de pulso (PRF) de 0,5 a 0,7 KHz, ajuste do ganho até desaparecimento dos artefatos e filtro baixo. Para as imagens em escala de cinzas, utilizou-se frequência de 18mHz.

Para avaliação de proliferação sinovial (PS), captação de power Doppler (pD) e presença de erosões, foi realizado o exame em ambas as mãos, nas seguintes articulações, com um total de 10 sítios: punhos, 2ª e 3ª metacarpofalangeanas (MTC) e 2ª e 3ª interfalangeanas proximais (IFP). As imagens foram feitas nos planos longitudinais e transversais. Os punhos, 2ª e 3ª metacarpofalangeanas foram analisados na face dorsal. As 2ª e 3ª articulações interfalangeanas proximais foram analisadas na face volar. Foi realizada a avaliação qualitativa e semi-quantitativa de proliferação sinovial pela escala de cinzas e da presença de sinal de pD, como utilizada em estudos prévios (62), descrita a seguir:

Avaliação semiquantitativa pela escala cinza da proliferação sinovial foi classificada como:

0 = ausente,

1 = leve (discreta imagem hipoeicoica/anecoica na cápsula articular),

2 = moderada (elevação da cápsula articular),

3 = severa ou marcada (caracteriza importante distensão da cápsula articular)

Avaliação semiquantitativa da atividade inflamatória sinovial, através da captação de sinal de power Doppler:

0 = ausente (nenhum sinal de pD, ou seja, sem fluxo intra-articular),

1 = leve (um sinal de pD),

2 = moderada (2 ou mais sinais de pD, ou seja <50% de fluxo intra-articular),

3 = severa ou marcada (> 50% de fluxo intra-articular).

A soma dos escores articulares individuais para PS e para captação de sinal de pD (escore 10 PS e escore 10 pD) foi usada para correlação com as variáveis clínicas, subtipos linfocitários e perfil de citocinas. Assim, os escores 10 PS e pD variam de 0 a 30, sendo 0 ausência de sinovite e 30 sinovite máxima em todas as articulações.

A presença ou ausência de erosões, representando dano estrutural da AR, foi pesquisada de acordo com a definição para erosão dos critérios OMERACT (presença de interrupção da cortical óssea vista em dois planos perpendiculares) (101). As erosões foram avaliadas de maneira dicotômica (presente ou ausente).

A avaliação das imagens obtidas foi feita de maneira independente pelos dois

examinadores. Todas as imagens foram armazenadas em HD externo e também em sistema de armazenamento virtual de dados, protegidos por senha.

## **5.6 Cálculo do tamanho da amostra**

O tamanho da amostra foi calculado para a pesquisa de células Treg e Th-17 em pacientes com AR, subdivididos em grupos por nível de atividade da doença (remissão, atividade leve, moderada e alta) e controles. Para poder de 80% considerando-se valor estatisticamente significativo valor  $P \leq 0.05$ , estimou-se obter 20 pacientes em cada grupo e 20 controles saudáveis.

## **5.7 Aspectos Éticos**

Todos os participantes receberam um termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice A), que abordava as questões do projeto, bem como a garantia de confidencialidade. O estudo foi aprovado pelo Comitê Científico e pelo Comitê de Ética do HSL da PUCRS (Parecer CEP 425.110).

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para *Windows*, versão 20.0 (IBM, Chicago, IL, EUA).

Variáveis quantitativas foram estatisticamente (teste de *Kolmogorov-Smirnov*) e graficamente analisadas quanto à normalidade da distribuição. Quando possível, as variáveis quantitativas não-normais foram transformadas logaritmicamente para permitir o uso de testes paramétricos. Variáveis categóricas foram descritas como números e percentuais.

Variáveis com distribuição normal foram apresentadas como média e desvio padrão (DP), e comparações entre os grupos foram feitas usando Teste *t* de *Student* ou análise de variância (ANOVA).

Variáveis ordinais ou quantitativas com distribuição não-normal foram descritas como mediana e intervalo interquartis (IIQ, representando os valores dos percentis 25 e 75), e as comparações entre grupos foram feitas usando os testes de *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis*.

Para pesquisa de correlação, utilizou-se o teste de correlação de *Spearman* ( $r_s$ , para análises envolvendo variáveis não-normais) ou teste de correlação de *Pearson* ( $r_p$ , para análises incluindo apenas variáveis com distribuição normal). Os intervalos de confiança (IC95%) para as correlações foram estimadas usando o método *Bootstrapping* com 1000 iterações. Nos casos em que se identificou graficamente a possibilidade de casos extremos (*outliers*) estarem influenciando o coeficiente de

correção de *Pearson*, foi realizado o teste de correlação de *Spearman*, bem como remoção dos casos extremos identificados por regressão linear simples.

Valores de P iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Modelos de regressão linear múltipla foram construídos para avaliar a possibilidade de associação entre achados ultrassonográficos e citocinas independentemente da atividade clínica da doença avaliada através do DAS28. A análise para identificação de casos extremos e casos altamente influentes foi feita como descrita em trabalho prévio (102). Coeficientes de regressão parcial e IC95% foram estimados para as variáveis independentes incluídas nos modelos.

A concordância interobservador para análise das imagens ultrassonográficas das articulações individuais foi avaliada através da estatística *kappa*. A correlação intraclassa foi utilizada para análise das variáveis contínuas na avaliação ultrassonográfica (escore 10 PS e escore 10 pD).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Características da população em estudo

Foram incluídos 101 pacientes, com média de idade de 55,8 anos ( $\pm 11.1$ anos), tempo de duração de doença de 6 (2-13) anos (mediana e IIQ). A média do DAS 28 (VSG) foi de 4.28 ( $\pm 1.64$ ) e do HAQ 1.11 ( $\pm 0.85$ ).

Houve perda de um paciente na análise das imagens ultrassonográficas e de 11 pacientes em parte da análise de subtipos linfocitários, por questões inerentes ao citômetro de fluxo. Plasma congelado foi disponível para a pesquisa das citocinas em 64 pacientes (a partir do paciente 38 até o paciente 101). As amostras de plasma dos primeiros 37 pacientes recrutados sofreram descongelamento acidental, o que impediu seu uso para o estudo.

As características da população estão descritas na tabela 1, havendo predomínio no sexo feminina e da raça branca. A maioria dos pacientes apresentava fator reumatoide positivo e estava em tratamento com metotrexate.

O número de pacientes em cada categoria de DAS28 está descrito na tabela 2, sendo que a maioria dos pacientes apresentava atividade moderada da doença.

Foram obtidas, aproximadamente, 2040 imagens de 1020 articulações para a realização deste estudo.



**TABELA 1 - Características da população (n = 101). Resultados apresentados em números absolutos e percentuais:**

	Número de pacientes
<b>Sexo feminino</b>	81 (80.19%)
<b>Raça branca</b>	86 (85.14%)
<b>Fator Reumatoide positivo</b>	64 (63.36%)
<b>Tabagismo</b>	15 (14.85%)
<b>Fibromialgia</b>	4 (3.96%)
<b>Uso de metotrexate</b>	84 (83.16%)
<b>Uso de leflunomide</b>	40 (39.60%)
<b>Uso de hidroxicloroquina</b>	25 (24.75%)
<b>Uso de sulfassalazina</b>	7 (6.93%)

**TABELA 2 - Número de pacientes (n = 101) por categoria de DAS 28\*. Resultados apresentados em números absolutos e percentuais:**

	Remissão	Atividade Leve	Atividade Moderada	Atividade Alta
<b>Número</b>				
<b>de</b>	15 (14.85%)	14 (13.86%)	39 (38.61%)	33 (32.67%)
<b>pacientes</b>				

\*Remissão: DAS28 até 2.6; Atividade leve: DAS28 2.6 a 3.2; Atividade moderada: DAS28 3.2 a 5.1; Atividade alta: DAS 28 acima de 5.1

## 7.2 Concordância interobservador para o exame ultrassonográfico

A concordância interobservador para o exame ultrassonográfico variou de 0.53 a 1, ou seja, de moderada a excelente. A melhor concordância foi observada na avaliação de presença ou ausência de erosões e o menor valor de *kappa*, na avaliação de proliferação sinovial em punhos (tabela 3).

A correlação intraclasse para o escore 10 PS foi de 0.964 (IC95% 0.899-0.986, P <0.001) e, para o escore 10 pD, 0.859 (IC95% 0.646-0.941, P <0.001).

**TABELA 3 - Valores de *kappa* para cada sítio de aquisição de imagem\* e alteração ultrassonográfica específica\*\*:**

Escaneamento ultrassonográfico	<i>Kappa</i>
Punho PS	0.53
Punho pD	0.76
2 MTC PS	0.71
2 MTC pD	0.88
2 MTC erosão	1
2 MTC radial erosão	1
3 MTC PS	0.86
3 MTC pD	1
3 MTC erosão	0.87
2 IFP PS	0.85
2 IFP pD	0.79
3 IFP PS	0.92
3 IFP pD	0.94
2ª IFP erosão	1
3ª IFP erosão	1

Nível de concordância interobservador de acordo com os valores de *kappa*: <0.20, concordância pobre; entre 0.21 e 0.40, concordância razoável; entre 0.41 e 0.60, concordância moderada; entre 0.61 e 0.80, concordância boa; entre 0.81 e 1 concordância excelente (103).

\*MTC = articulação metacarpofalangeana; IFP = articulação interfalangeana proximal; \*\*PS = proliferação sinovial na escala de cinzas; pD = captação de sinal de power Doppler.

### 7.3 Correlação entre achados ultrassonográficos e clínicos

As correlações entre os escores ultrassonográficos e as medidas clínicas de avaliação da doença estão descritas na tabela 4. A correlação entre o escore 10 PS e o DAS 28 foi limítrofe, não havendo outras correlações.

**TABELA 4 - Coeficientes de correlação (rs) entre os escores ultrassonográficos e as medidas de avaliação clínica (n=101):**

	DAS 28	HAQ
<b>Escore 10 PS*</b>	0.195	-0.074
	P = 0.051	P=0.462
<b>Escore 10 pD**</b>	0.065	-0.028
	P=0.518	P=0.781

\*Escore 10 PS = soma dos escores individuais de proliferação sinovial das 10 articulações examinadas

\*\*Escore 10 pD = soma dos escores individuais de captação de power Doppler das 10 articulações examinadas.

Pacientes que apresentavam pelo menos uma erosão óssea em qualquer um dos sítios examinados pelo ultrassom apresentaram DAS 28 numericamente mais elevado em relação aos pacientes que não apresentavam erosão (média de DAS 28  $4.56 \pm 1.76$  versus  $3.86 \pm 1.40$ ). No entanto, não houve associação de erosão com DAS 28 ( $P=0.079$ ). Também não se observou associação de erosão com escore HAQ ( $P=0.057$ ).

Por outro lado, erosão se associou com escore 10 PS e com escore 10 pD de maneira significativa ( $P=0.002$  para ambas variáveis, figuras 1 e 2, respectivamente). Do total de 100 pacientes com imagens ultrassonográficas, em dois deles as imagens de erosão não foram registradas.

FIGURA 1 - Associação entre escore 10 PS e presença de erosões (teste de Mann-Whitney, n=98)

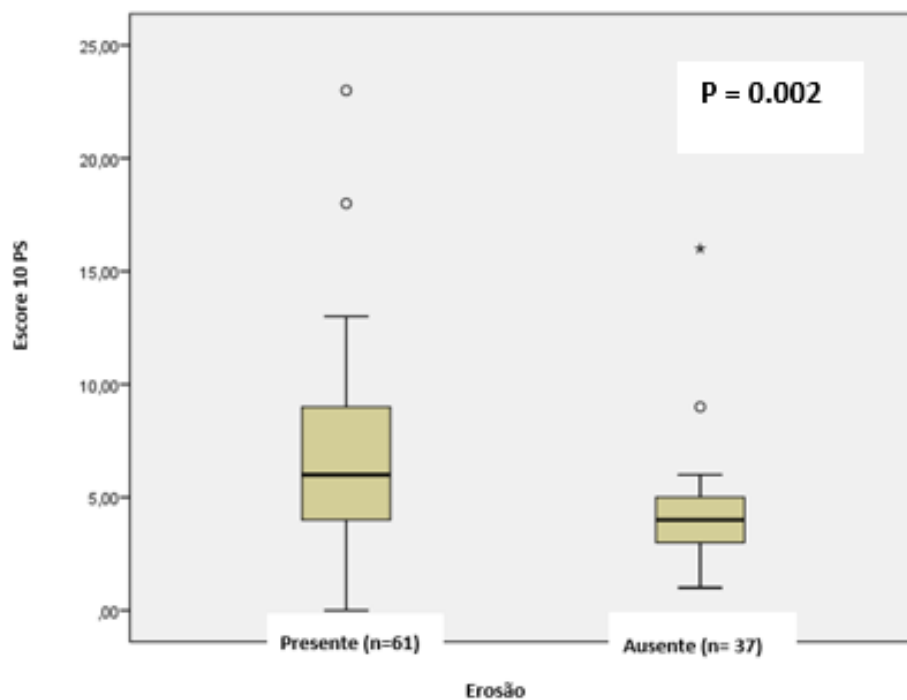
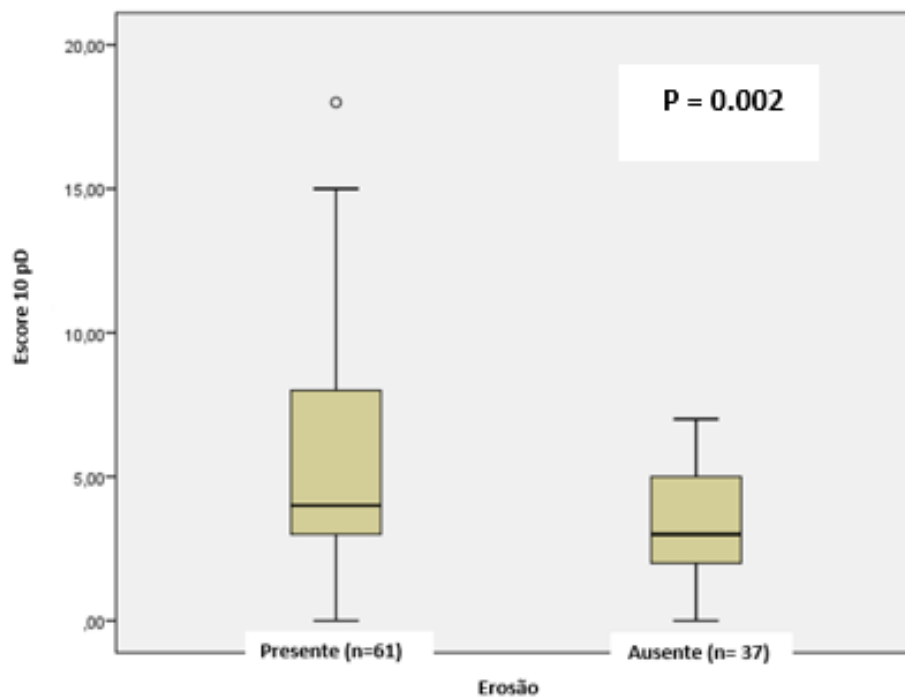
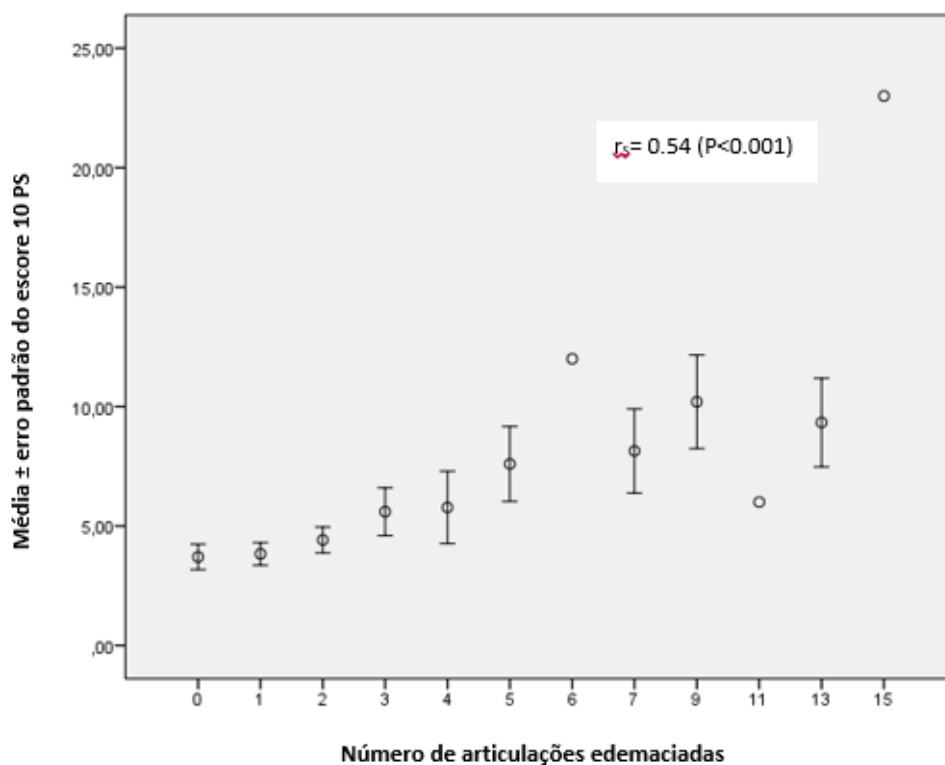


FIGURA 2 - Associação entre escore 10 pD e presença de erosões (teste de Mann-Whitney, n=98)

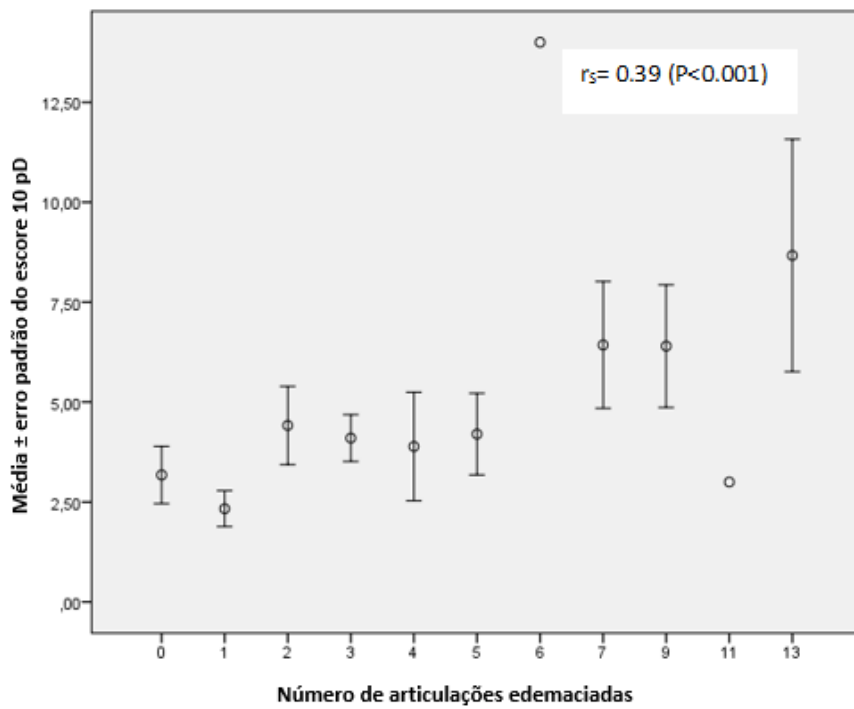


Ao avaliarmos os achados de exame físico articular e os achados ultrassonográficos, observamos associação estatisticamente significativa da contagem de articulações edemaciadas com escore 10 PS e escore 10 pD ( $r_s=0.54$ ,  $P<0.001$  e  $r_s=0.39$ ,  $P<0.001$ ; figuras 3 e 4, respectivamente), bem como com a presença de erosões ( $P<0.001$ ; figura 5). Não observamos associação entre contagem de articulações dolorosas com escore 10 PS ( $r_s = -0.071$   $P = 0.524$ ), escore 10 pD ( $r_s = -0.196$   $P = 0.078$ ) ou presença de erosões ( $P=0.248$ ).

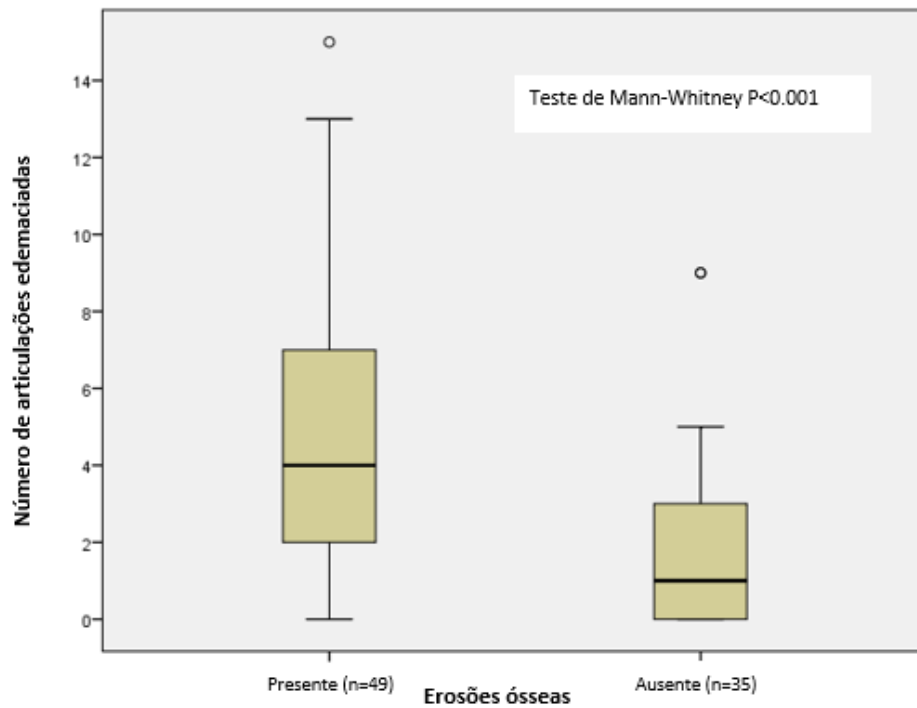
**FIGURA 3 – Associação do número de articulações edemaciadas com escore 10 PS.**  
rs: coeficiente de correlação de Spearman



**FIGURA 4 – Associação do número de articulações edemaciadas com escore 10 pD.  
rs: coeficiente de correlação de Spearman**



**FIGURA 5 – Associação do número de articulações edemaciadas com erosões ósseas.**



#### **7.4 Achados ultrassonográficos, clínicos e linfócitos Treg e Th-17**

As correlações entre subpopulações linfocitárias e achados ultrassonográficos, DAS28, e contagem de articulações edemaciadas e dolorosas estão expostas na tabela 5; não houve significância estatística nestas correlações.

Não se observou associação de células Treg e Th-17 com presença de erosões ultrassonográficas ( $P=0.831$  e  $P=0.632$ , respectivamente).

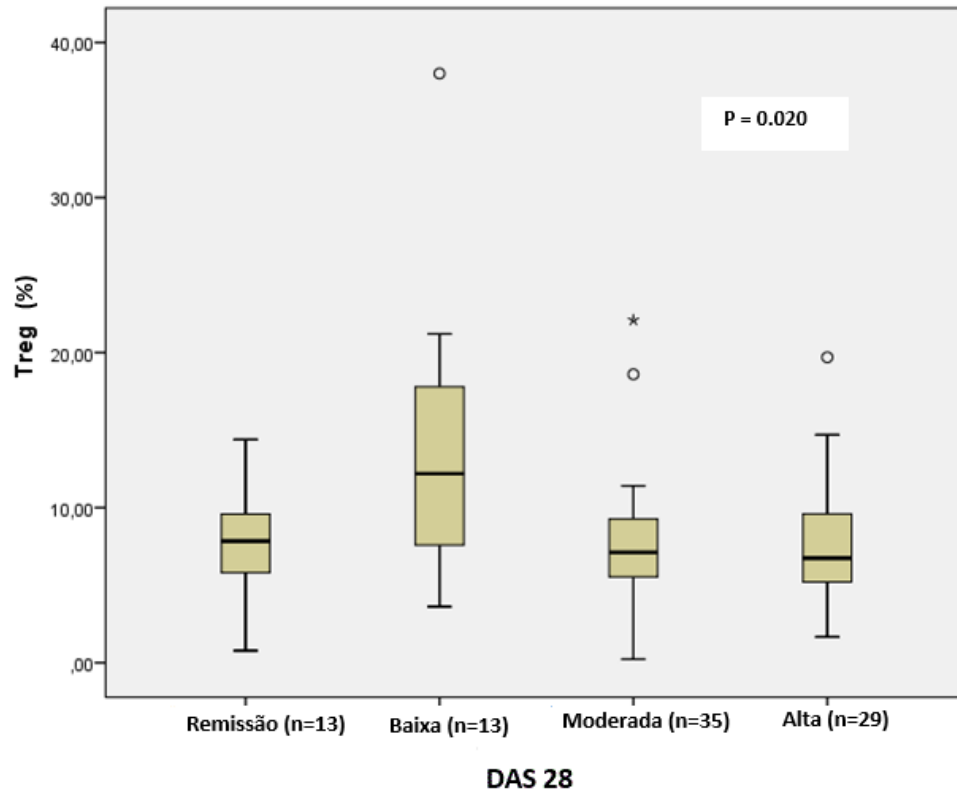
Quando a atividade da doença foi categorizada de acordo com o DAS 28, um percentual mais elevado de células Treg se associou estatisticamente com baixa atividade da doença reumatoide ( $P=0.002$ , figura 6). Uma eventual associação de células Th-17 com o DAS 28 categorizado em remissão, baixa atividade, moderada atividade e alta atividade não foi confirmada ( $P=0.070$ ).

**TABELA 5 - Coeficientes de correlação (rs) entre subpopulações linfocitárias e escores ultrassonográficos, DAS28 e número de articulações edemaciadas e dolorosas (n=90)**

	<b>Treg</b>	<b>Th-17</b>
<b>Escore 10 PS</b>	0.122	0.083
	P = 0.254	P=0.438
<b>Escore 10 pD</b>	0.056	-0.060
	P=0.602	P=0.575
<b>DAS28</b>	-0.181	-0.089
	P=0.088	P=0.402
<b>Contagem de articulações dolorosas</b>	-0.0186	-0.084
	P=0.079	P=0.430
<b>Contagem de articulações edemaciadas</b>	-0.0083	-0.015
	P=0.437	P=0.886



**FIGURA 6 - Associação entre percentual de células Treg e nível de atividade de doença pelo DAS 28 (teste de Kruskal-Wallis, n=90).**



## **7.5 Achados ultrassonográficos, clínicos e citocinas**

Plasma congelado para dosagem de citocinas foi disponível em 64 pacientes. As citocinas também foram dosadas em 30 controles saudáveis, pareados por sexo e idade, provenientes da comunidade. As características dos pacientes testados para citocinas e controles estão descritas na tabela 6, havendo predomínio de mulheres brancas com doença de longa evolução, com fator reumatoide positivo, sob tratamento com metotrexate.

A maioria dos 64 pacientes testados para citocinas (42.2%) apresentava atividade da doença moderada pelo DAS28; 23.4% apresentavam doença com alta atividade; 20.3% apresentavam doença em baixa atividade e 14.1% estavam com a doença em remissão.

TABELA 6–Características dos pacientes testados para citocinas e controles

	Pacientes (n=64)	Controles (n=30)
Idade – média ± DP (anos)	55.3 ± 9.8	55.9 ± 11.1
Sexo feminino– n (%)	50 (78.1)	23 (76.7)
Branco – n (%)	55 (85.9)	27 (90)
Tempo de duração da AR mediana e IIQ (anos)	5 (2-11)	
Fator reumatoide positivo – n (%)**	39/62 (62.9)	
Fibromialgia – n (%)	4 (6.2)	
Tabagismo – n (%)	9 (14.1)	
Prednisona – n (%)†	39 (60.9)	
Metotrexate – n (%)†	52 (81.2)	
Leflunomida – n (%)†	26 (40.6)	
Hidroxicloroquina ou cloroquina – n (%)†	14/64 (21.8)	
Sulfassalazina– n (%)†	6 (9.4)	
HAQ – mediana e intervalo interquartil	1.3 (0.2 – 1.8)	
DAS28 – média ± DP	4.02 ± 1.5	

\* Apenas 20 controles foram testados para VEGF. \*\*Dado não disponível para todos os pacientes; os números representam pacientes com resultado positivo sobre o total de pacientes testados. †Uso corrente. DP: Desvio-padrão. IIQ: intervalo interquartil. AR: artrite reumatoide. mg: miligramas. HAQ: *health assessment questionnaire*. DAS28: escore de atividade da doença em 28 articulações.

Os níveis plasmáticos de citocinas foram significativamente mais elevados nos pacientes com AR do que nos controles, exceto para VEGF, conforme descrito na tabela 7.

**TABELA 7 – Comparação dos níveis de citocinas plasmáticas entre pacientes e controles**

Citocinas (pg/ml)	Pacientes (N=64)		Controles (N=30) *		P**
	Média (DP)	Mediana (IIQ)	Média (DP)	Mediana (IIQ)	
IL-2	7.35 (0.92)	7.02 (6.78 a 7.73)	6.75 (0.59)	6.68 (6.46 a 6.88)	< 0.001
IL-4	7.49 (1.08)	7.19 (6.75 a 7.90)	6.70 (0.52)	6.52 (6.41 a 6.94)	< 0.001
IL-6	10.37 (1.88)	10.03 (9.04 a 10.91)	8.76 (0.77)	8.57 (8.27 a 8.97)	< 0.001
IL-10	11.52 (1.45)	11.05 (10.64 a 12.01)	10.4 (0.64)	10.36 (9.98 a 10.85)	< 0.001
IL-17	8.77 (3.34)	8.15 (6.86 a 9.84)	7.18 (1.80)	7.18 (6.21 a 8.28)	0.017
TNF	8.52 (1.00)	8.27 (7.95 a 8.92)	7.72 (0.46)	7.83 (7.37 a 8.06)	< 0.001
IFN- $\gamma$	8.21 (1.79)	7.75 (7.09 a 8.83)	7.18 (1.05)	7.42 (6.50 a 7.72)	0.011
VEGF	10.94 (6.12)	8.87 (7.05 a 13.10)	12.63 (6.74)	10.19 (7.00 a 16.86)	0.268

\* N=30 para todas as citocinas, exceto para VEGF que foi testado em 20 controles \*\* Teste T de Student para comparação de IL-6 e IL-17; Teste de Mann-Whitney para demais citocinas. DP: Desvio-padrão; IIQ: intervalo interquartil.

As correlações entre as citocinas individuais nos pacientes com AR estão apresentadas na tabela 8. Todas as citocinas se correlacionaram entre si, exceto por VEGF.

**TABELA 8 –Correlação entre citocinas nos pacientes com AR (n=64). Números apresentados correspondem ao coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ )**

CITOCINAS	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF	IFN- $\gamma$	VEGF
IL-2		0.738**	0.376**	0.559**	0.372**	0.744**	0.243*	0.216*
IL-4			0.459**	0.619**	0.360**	0.749**	0.302**	0.121 <sup>§</sup>
IL-6				0.514**	0.218*	0.490**	0.205*	0.124 <sup>§</sup>
IL-10					0.376**	0.639**	0.412**	0.219*
IL-17						0.340**	0.308**	0.121 <sup>§</sup>
TNF							0.319**	0.154 <sup>§</sup>
IFN- $\gamma$								0.101 <sup>§</sup>

\*Associação estatisticamente significativa com  $P \leq 0.05$ . \*\* Associação estatisticamente significativa com  $P \leq 0.01$ . <sup>§</sup>Associação não significativa estatisticamente.

As correlações das citocinas com parâmetros clínicos e ultrassonográficos estão descritas nas tabelas 9 e 10, respectivamente. Entre todas as citocinas testadas, IL-6 foi associada estatisticamente de modo consistente com DAS28 e parâmetros ultrassonográficos de atividade inflamatória (Figura 7 e 8, respectivamente).

IL-6 foi associada a DAS28 ( $r_s$  0.31 IC95% 0.07 a 0.52), VSG ( $r_s$  0.43 IC95% 0.19 a 0.62) e contagem de articulações edemaciadas ( $r_s$  0.39 95%CI 0.15 a 0.59). Não houve associação de IL-6 com contagem de articulações dolorosas e HAQ.

Observou-se associação estatística de níveis de IL-6 com escore 10 pD ( $r_s$  0.33 IC95% 0.07 a 0.56), captação de pD em punhos direito e esquerdo ( $r_s$  0.34 IC95% 0.11 a 0.54 e  $r_s$  0.45 IC95% 0.21 a 0.64, respectivamente) e PS em punhos direito e esquerdo ( $r_s$  0.40 IC95% 0.20 a 0.59 e  $r_s$  0.35 IC95% 0.08 a 0.57, respectivamente). Não houve associação entre IL-6 e escore 10 PS.

Não houve associação entre nenhuma das citocinas testadas e a presença de erosões ósseas ( $P \geq 0.17$  para todos os testes).

**TABELA 9 – Correlações entre todas as citocinas testadas nos pacientes com AR (n=64) e parâmetros clínicos. Números apresentados correspondem ao coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) e intervalos de confiança 95% (IC95%).**

	DAS28	HAQ	VSG	Dolorosas	Edemaciadas	Idade
<b>IL-2</b>	-0.08 (-0.33 a 0.17)	-0.06 (-0.29 a 0.17)	-0.14 (-0.39 a 0.09)	-0.03 (-0.29 a 0.23)	0.06 (-0.18 a 2.71)	-0.16 (-0.40 a 0.11)
<b>IL-4</b>	-0.004 (-0.26 a 0.25)	-0.06 (-0.33 a 0.18)	0.01 (-0.26 a 0.27)	0.02 (-0.25 a 0.28)	0.17 (-0.74 a 0.39)	-0.02 (-0.28 a 0.25)
<b>IL-6</b>	0.31 (0.07 a 0.52) *	0.14 (0.10 a 0.39)	0.43 (0.19 a 0.62) *	0.09 (-0.17 a 0.32)	0.39 (0.15 a 0.59) *	0.23 (-0.43 a 0.48)
<b>IL-10</b>	-0.11 (-0.37 a 0.14)	-0.05 (-0.31 a 0.20)	-0.03 (-0.26 a 0.22)	-0.12 (-0.37 a 0.14)	0.09 (-0.14 a 0.31)	-0.04 (-0.29 a 0.20)
<b>IL-17</b>	0.08 (-0.17 a 0.33)	0.13 (-0.09 a 0.35)	-0.16 (-0.40 a 0.10)	0.12 (-0.15 a 0.35)	0.17 (-0.91 a 0.40)	-0.13 (-0.36 a 0.15)
<b>TNF</b>	-0.01 (-0.27 a 0.23)	-0.04 (-0.29 a 0.21)	-0.004 (-0.25 a 0.23)	0.03 (-0.24 a 0.30)	0.07 (-0.15 a 0.32)	-0.04 (-0.29 a 0.22)
<b>IFN</b>	-0.09 (-0.34 a 0.17)	0.004 (-0.25 a 0.24)	-0.22 (-0.45 a 0.03)	0.05 (-0.19 a 0.32)	-0.04 (-0.29 a 0.19)	-0.14 (-0.38 a 0.12)
<b>VEGF</b>	0.18 (-0.77 a 0.41)	0.12 (-0.14 a 0.36)	0.07 (-0.20 a 0.33)	0.15 (-0.12 a 0.40)	0.14 (-0.13 a 0.41)	-0.06 (-0.30 a 0.20)

\*Estatisticamente significante com  $P \leq 0.01$ .

**TABELA 10 –Correlações entre todas as citocinas testadas nos pacientes com AR (n=64) e parâmetros ultrassonográficos. Números apresentados correspondem ao coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) e intervalos de confiança 95% (IC95%).**

	Punho direito pD	Punho esquerdo pD	Punho Direito PS	Punho esquerdo PS	Escore 10 pD	Escore 10 PS
<b>IL-2</b>	0.17 (-0.07 a 0.40)	0.05 (-0.21 a 0.32)	0.22 (-0.01 a 0.49)	0.05 (-0.20 a 0.30)	-0.04 (-0.29 a 0.22)	-0.12 (-0.37 a 0.15)
<b>IL-4</b>	0.26 (0.01 a 0.48)	0.20 (-0.58 a 0.46)	0.29 (0.05 a 0.54) *	0.15 (-0.11 a 0.39)	0.03 (-0.21 a 0.29)	-0.04 (-0.29 a 0.21)
<b>IL-6</b>	0.34 (0.11 a 0.54) **	0.45 (0.21 a 0.64) **	0.40 (0.20 a 0.59) **	0.35 (0.08 a 0.57) **	0.33 (0.07 a 0.56) **	0.23 (-0.03 a 0.46)
<b>IL-10</b>	0.19 (-0.05 a 0.43)	0.12 (-0.11 a 0.34)	0.17 (-0.12 a 0.43)	0.06 (-0.17 a 0.28)	0.04 (-0.21 a 0.30)	-0.08 (-0.34 a 0.18)
<b>IL-17</b>	0.16 (-0.13 a 0.41)	0.18 (-0.10 a 0.44)	0.14 (-0.10 a 0.38)	0.12 (-0.12 a 0.34)	0.02 (-0.24 a 0.27)	-0.08 (-0.35 a 0.17)
<b>TNF</b>	0.23 (-0.02 a 0.47)	-0.03 (-0.31 a 0.23)	0.17 (-0.08 a 0.43)	0.002 (-0.25 a 0.25)	-0.11 (-0.36 a 0.16)	-0.15 (-0.39 a 0.10)
<b>IFN</b>	-0.10 (-0.34 a 0.14)	0.06 (-0.18 a 0.31)	0.02 (-0.26 a 0.29)	0.03 (-0.24 a 0.29)	-0.20 (-0.45 a 0.09)	-0.25 (-0.47 a 0.02)
<b>VEGF</b>	0.04 (-0.20 a 0.26)	-0.05 (-0.29 a 0.20)	0 (-0.26 a 0.23)	-0.1 (-0.35 a 0.14)	-0.10 (-0.35 a 0.15)	-0.009 (-0.27 a 0.23)

\*Associação estatisticamente significativa com  $P \leq 0.05$ . \*\* Associação estatisticamente significativa com  $P < 0.01$ .



FIGURA 7. Correlação de DAS28 com IL-6 ( $r_P= 0.40$ , IC95% 0.14 a 0.59,  $P=0.001$ ). A correlação estatística foi confirmada usando correlação de Spearman ( $r_S= 0.31$ , IC95% 0.07 a 0.52,  $P=0.013$ ) e removendo 4 outliers ( $r_P= 0.32$ , IC95% 0.06 a 0.51,  $P=0.015$ ).  $r_P$ = Coeficiente de correlação de Pearson;  $r_S$ = Coeficiente de correlação de Spearman.

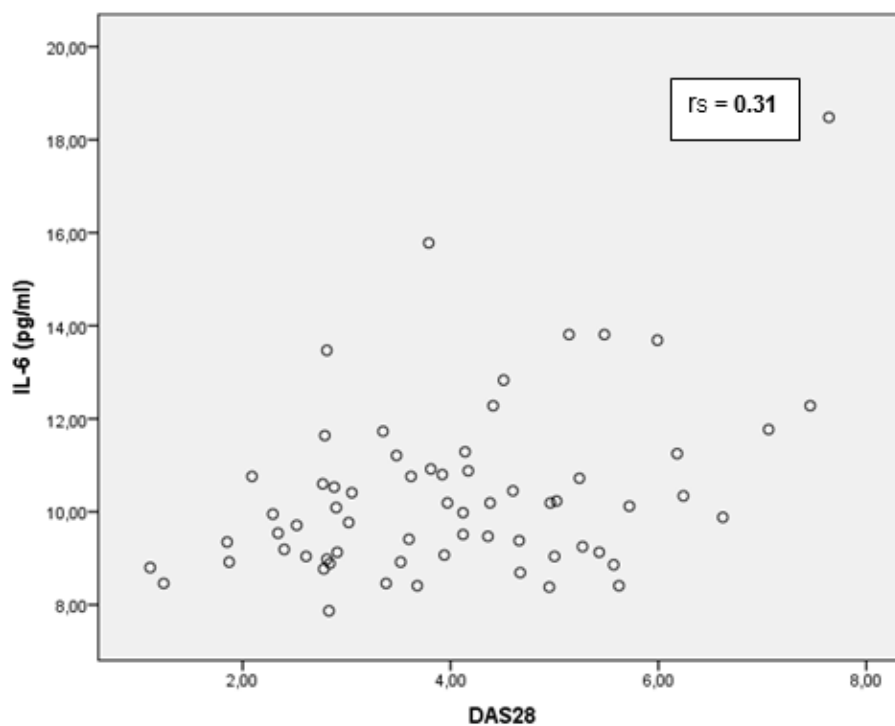
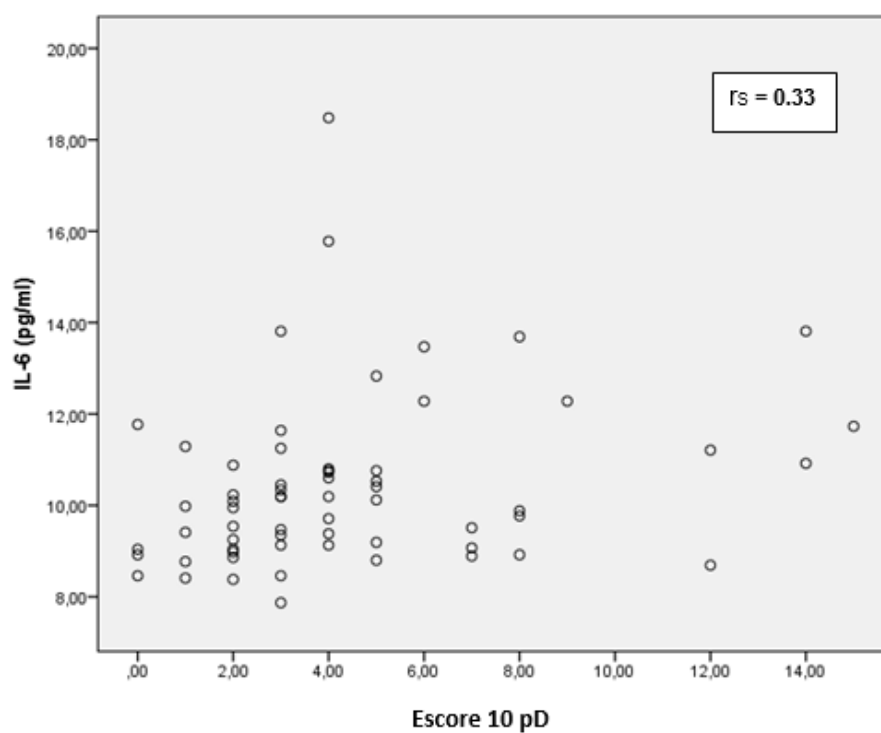


FIGURA 8. Correlação de escore 10 pD com IL-6 ( $r_S= 0.33$ , IC95% 0.06 a 0.56,  $P=0.008$ ).  $r_S$ = Coeficiente de correlação de Spearman.



Utilizando modelo de regressão linear múltipla, observou-se que o Escore 10 pD foi positivamente associado a IL-6 independente de DAS28 (P=0.025; tabela 11). Após remoção de 6 casos identificados como *outliers*, a associação independente de escore 10 pD e IL-6 foi reforçada (P=0.009, tabela 12).

**TABELA 11: Modelo de regressão linear múltipla sendo IL-6 a variável dependente\***

Variáveis Independentes	Coefficiente de Regressão Parcial	IC95%	P
<b>Escore 10 pD</b>	0.142	0.018 a 0.266	0.025
<b>DAS28</b>	0.513	0.226 a 0.801	0.001
<b>Constante</b>	7.715	6.365 a 9.064	<0.001

\*Resultados adicionais do modelo de regressão linear múltipla: R<sup>2</sup> 0.231; R<sup>2</sup>ajustado 0.205  
n =63. Teste de Kolmogorov-Smirnov P=0.719.

**TABELA 12: Modelo de regressão linear múltipla sendo IL-6 a variável dependente\* após remoção de 6 casos identificados como *outliers***

Variáveis Independentes	Coefficiente de Regressão Parcial	IC95%	P
<b>Escore 10 pD</b>	0.176	0.046 a 0.306	0.009
<b>DAS28</b>	0.336	0.113 a 0.558	0.004
<b>Constante</b>	8.121	7.047 a 9.194	<0.001

\*Resultados adicionais do modelo de regressão linear múltipla: R<sup>2</sup> 0.227; R<sup>2</sup>ajustado 0.199  
n =63. Teste de Kolmogorov-Smirnov P=0.719.

## 8 DISCUSSÃO

A investigação da relação entre imagens ultrassonográficas que representam inflamação e erosão ósseas com as células e seus produtos responsáveis diretamente pelo processo inflamatório é um tema que tem interessado os pesquisadores em AR envolvidos com ultrassonografia. Neste contexto, examinamos clinicamente pacientes com diagnóstico inequívoco de AR, adquirimos imagens de US das articulações das mãos, pesquisamos subtipos linfocitários e citocinas de importância na patogênese da doença, e buscamos suas correlações.

Neste estudo transversal incluímos uma amostra consecutiva de pacientes com AR estabelecida em tratamento com DMCD sintéticas. Não selecionamos pacientes com uso de DMCD biológicas por conta da ação imune específica dessas drogas, que poderia influenciar diretamente a pesquisa de subtipos linfocitários e citocinas proposta.

Apesar de termos recrutado 101 pacientes, a pesquisa de células Treg/Th-17 só pode ser feita em 90 indivíduos por perdas durante a citometria de fluxo. Plasma congelado para a dosagem das citocinas foi disponível apenas em 64 pacientes. Tais perdas foram não intencionais e não configuraram perda seletiva de amostras.

Nossa amostra, composta predominantemente por indivíduos do sexo feminino, de meia idade, caucasianos, com fator reumatoide positivo, obedece às características da população de AR descritas na literatura, na população brasileira (104). Observamos, ao subdividirmos os pacientes por categoria de DAS28, que a maioria se encontra na faixa de atividade moderada da doença. Há menor quantidade de indivíduos em baixa atividade e remissão, o que poderia refletir, na prática, o menor interesse dos pacientes em fazer a

avaliação ultrassonográfica e participar da pesquisa no momento em que estão sem sintomas da doença.

Os resultados para concordância interobservador e correlação interclasse para o exame ultrassonográfico demonstram que ambos os examinadores do estudo estavam alinhados quanto à técnica ultrassonográfica empregada, aquisição e interpretação das imagens.

A introdução da ultrassonografia como método complementar ao exame físico na assistência aos pacientes durante as consultas com reumatologista ainda não é amplamente disponível em nosso país, estando concentrada em centro terciários de ensino e pesquisa, e em consultórios privados das regiões sul e sudeste do Brasil (105).

O treinamento em ultrassonografia para o reumatologista não é, ainda, formalizado pela Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR), embora haja o apoio da SBR na realização de cursos teórico-práticos específicos durante o congresso brasileiro de reumatologia e haja um projeto para certificação oficial. No exterior, cursos específicos são periodicamente promovidos durante os maiores congressos internacionais da especialidade, e há preocupação com a padronização da educação do reumatologista no método de imagem, originando estudos que propõe fluxogramas de aprendizagem, ensino e avaliação de habilidades (106).

Nos últimos três anos, tanto o EULAR como o ACR divulgaram em seus sítios eletrônicos programas de certificação do reumatologista em US: *Eular Competency Assessment in MSUS* e *Musculoskeletal Ultrasound Certification in Rheumatology* (RhMSUS).

Além dos treinamentos teórico e práticos disponíveis, todavia, especialistas afirmam a importância do treino rotineiro sob supervisão de um investigador experiente,

e de aperfeiçoamento constante para que o reumatologista consiga desenvolver as habilidades necessárias para a prática do US (107).

Em nosso trabalho, os escores 10 PS e pD não se correlacionaram com a avaliação de atividade da doença pelo DAS28 e de capacidade funcional pelo HAQ. Por questões logísticas na implementação do estudo, que envolviam estrutura física da sala de atendimento, posicionamento da maca de exame e do ecógrafo, além de tempo disponível para exame de cada paciente, optamos por usar um escore que incluísse apenas articulações das mãos, sendo, assim, facilitada a aquisição das imagens. O uso de um escore que incluísse articulações dos pés implicaria em alterações organizacionais que dificultariam a coleta de dados. O escore que optamos utilizar, composto por articulações das mãos exclusivamente, foi previamente usado para acessar anormalidades ultrassonográficas em AR inicial, e encontrou correlações com DAS28 que variaram de 0.31 a 0.35 (108).

Apesar de ainda não haver consenso sobre qual o melhor conjunto de articulações (e talvez tendões) a ser empregado na avaliação ultrassonográfica da AR, o fato de termos excluído a avaliação dos pés pode ter contribuído para não encontrarmos correlação dos escores ultrassonográficos com DAS28 em nossa população de AR estabelecida, sendo uma limitação do nosso estudo.

No entanto, sabe-se que, em pacientes com AR estabelecida, o exame físico articular pode ser de problemática execução e interpretação, especialmente porque os ICAD nem sempre configuram métricas de simples aplicabilidade na prática. Já foi demonstrado que, em doença de longa evolução, a contagem articular pode ser enviesada pelas deformidades (109,110) e que os ICAD amplamente utilizados na assistência perdem acurácia quando há associação de fibromialgia com AR (102). Ainda, a avaliação criteriosa de cada componente do DAS28 no momento de tomada de decisão terapêutica

é necessária a fim de evitar erros de interpretação do índice por elevação velocidade de hemossedimentação secundária a outros motivos que não atividade da AR, por exemplo (111).

Apesar de não termos encontrado associações entre US e DAS28, observamos associação de contagem de articulações edemaciadas com os achados de imagem do US. De modo muito interessante, o mesmo não foi observado com a contagem de articulações dolorosas. Sabidamente, a atividade inflamatória é superestimada pelo DAS28 em pacientes com fibromialgia - uma condição cuja exacerbação da dor é predominante - associada a AR (112), e estudo recente não documentou associação de achados de US com DAS28 nesse mesmo grupo de indivíduos com fibromialgia e AR (113). Do mesmo modo, Wolfe e colegas demonstram que o US é útil em detectar atividade inflamatória verdadeira em pacientes com AR e fibromialgia e ,também, sustentam que os ICAD são falhos nessa população, pois confundem a dor inflamatória com dor por outras razões (114). Considerando que a percepção da dor é altamente subjetiva e pode ser influenciada por diversas variáveis, incluindo fatores sócio culturais (115), podemos considerar a possibilidade de que, assim como ocorre na fibromialgia, a dor possa não refletir isoladamente atividade inflamatória na AR estabelecida, podendo confundir a avaliação da atividade da doença nesse grupo de pacientes.

Por outro lado, observamos correlação de edema articular com proliferação sinovial, captação de power Doppler e presença de erosões. Em conjunto, esses achados sugerem que a contagem de articulações edemaciadas em AR estabelecida está mais proximamente relacionada a atividade da doença e dano estrutural do que a contagem de articulações dolorosas.

A progressão estrutural na AR tem sido associada com edema e não dor articular em estudo prévios (18-19). Dougados e colegas reportaram que a presença de sinovite

persistente (presença simultânea de edema articular ao exame físico com PS e pD ao US) está relacionada a deterioração estrutural na AR (71). De fato, observamos, também, em nosso estudo associação entre escores PS e pD com a presença de erosões ósseas.

Até hoje, os estudos de US em AR, independente do escore ultrassonográfico utilizado, demonstram coeficientes de correlação no máximo moderados com os ICAD (85–91). A falta de correlações boas ou excelentes pode estar relacionada a grande dificuldade em expressar a atividade inflamatória global de uma doença tão complexa como a AR em um único escore, seja ele clínico ou de imagem. Os reumatologistas têm utilizado o DAS28 e outros ICAD como padrão ouro para acessar clinicamente o grau de atividade da AR há muitos anos (99), e essas ferramentas claramente trouxeram grande progresso no monitoramento e na abordagem terapêutica dos pacientes. No entanto, apesar de os ICAD serem atualmente os melhores métodos validados para monitorização da AR, o instrumento ideal para medir objetivamente inflamação na assistência ao paciente parece ainda não existir, sendo essa preocupação já presente em editorial, publicado há mais de dez anos, por Pope and Harth (116). A falta de perfeição dos ICAD é corroborada, por exemplo, pelo fato de técnicas de imagem serem mais sensíveis do que o exame físico na detecção de artrite (63,117–119), e pelo fato de o US possivelmente ser mais confiável que o DAS28 para avaliar atividade da doença (65). A melhor maneira de combinar os dados clínicos, de laboratório e de imagem na quantificação de atividade inflamatória em pacientes com AR ainda necessita ser definida.

Não encontramos neste estudo associação dos subtipos linfocitários Treg e Th-17 com DAS28, HAQ, escores de PS e pD e erosões no US. Ao categorizarmos o DAS28 por nível de atividade da doença, observamos que o estado de baixa atividade se associou a percentual maior de Treg no sangue periférico, o que está de acordo com o papel regulatório desses linfócitos proposto na literatura (38). Não identificamos estudos

prévios abordando Treg/Th-17 e achados de ultrassom em AR, e nossos achados foram negativos. No entanto, em contraposto à utilização de sangue periférico em nosso trabalho, podemos hipotetizar que a pesquisa local desses linfócitos, ou seja, intrarticular, no ambiente sinovial (por artrocentese e/ou biópsia sinovial) talvez possa se correlacionar com PS e pD da articulação em questão, *in situ*.

Observamos, em nossa amostra, que todas as citocinas do sangue periférico, com exceção de VEGF, foram mais elevadas em pacientes com AR do que em controles saudáveis de maneira estatisticamente significativa. As citocinas, nos pacientes com AR, se correlacionaram entre si, com exceção, também, de VEGF.

Apesar de estarem em concentrações mais elevadas em pacientes do que em controles, as citocinas testadas, com exceção de IL-6, não se associaram significativamente com as variáveis clínicas e ultrassonográficas.

Como esperado, IL-6 foi associada a atividade clínica da AR pelo DAS28 e elevação de VSG (120). Também observamos associação de IL-6 com a contagem de articulações edemaciadas. Ressaltamos o fato de não ter ocorrido associação de IL-6 com contagem de articulações dolorosas, apenas edemaciadas, um parâmetro objetivo de exame físico, também associado a alterações no US, conforme descrito previamente.

Nosso principal achado foi demonstrar a associação de IL-6 plasmática com sinovite ultrassonográfica global, representada pelo escore 10 pD, em pacientes com AR estabelecida em uso de DMCD não biológicas. Essa associação foi estatisticamente independente de DAS28, o padrão para avaliação da atividade da doença em AR. Também observamos a associação de IL-6 com inflamação em articulações individuais de clássica importância na AR (pD e PS em punhos). Até o momento, não encontramos publicações similares envolvendo AR estabelecida. Um estudo prévio recente também demonstrou associação de IL-6 com achados ultrassonográficos de sinovite, mas em uma



população diversa: pacientes com AR inicial sem tratamento imunossupressor introduzido (96). Nossa amostra foi composta de pessoas com AR de longa data recebendo DMCD sintéticas e, portanto, as características da população do nosso estudo diferem da maneira importante das publicadas por Baillet e colaboradores (96).

O fato de termos encontrado associações apenas de IL-6 (dentre as demais citocinas) com sinovite no US poderia, em parte, ser explicado pela constatação de que o ambiente sinovial inflamado é uma fonte proeminente desta citocina na AR. IL-6 estimula angiogênese (121), o que fortalece sua associação com os escores de pD – que capta a presença de microvasos e constitui o grande sinal de inflamação ativa no US. Observamos, ainda, associação de IL-4 com PS em punho direito, mas este foi, provavelmente, um evento espúrio.

Há outros poucos estudos envolvendo IL-6 e parâmetros de US em diferentes cenários. Um deles demonstrou associação de produção local de IL-6 em tecido sinovial (obtido por biópsia sinovial de articulações das mãos) com sinovite detectada por RNM e US em pacientes com AR (122). Um estudo genético testando polimorfismos para IL-6 (IL-6-174G/C, relacionado com aumento da produção de IL-6) e *transforming growth factor  $\beta$*  (869C/T) identificou associação desses alelos com erosões ósseas detectadas por US; dados sobre PS e pD ou IL-6 plasmática não foram reportados (123). Ball e colaboradores encontraram associação de IL-6 no plasma com sinovite no US em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico que apresentavam artrite como característica proeminente da doença (97).

IL-6 é uma citocina pró inflamatória cuja principal fonte vem de macrófagos ativados e sinoviócitos intrarticulares em portadores de AR (121). IL-6 atua nas respostas imunes inata e adaptativa, através da mediação de dano ósseo e cartilaginoso, incluindo a indução de proteínas de fase aguda e estimulação de linfócitos T e B, sinoviócitos e

osteoclastos (23,124). Juntamente com TNF, IL-6 é considerada uma citocina central na patogênese da AR, sendo hierarquicamente importante em relação às demais citocinas envolvidas no processo de perpetuação da inflamação (23). Tanto IL-6 como TNF são atualmente considerados potenciais biomarcadores no contexto da AR (125), ressaltando novamente sua relevância.

## 9 CONCLUSÕES

Podemos concluir, em nossa amostra de pacientes com AR estabelecida em tratamento com DMCD sintéticas, que:

- Escore 10 PS, escore 10 pD e erosão óssea no US não foram associados estatisticamente com DAS 28 e HAQ.
- A presença de erosão óssea no US foi associada estatisticamente a escore 10 PS e escore 10 pD.
- A contagem de articulações edemaciadas foi associada estatisticamente com escore 10 PS, escore 10 pD e erosões ósseas no US.
- A contagem de articulações dolorosas não foi associada estatisticamente com escore 10 PS, escore 10 pD e erosões ósseas no US.
- Maior percentual de linfócitos Treg do sangue periférico foi associado estatisticamente a escores baixos de atividades da doença avaliados no DAS 28.
- Linfócitos Treg e Th-17 do sangue periférico não foram associados estatisticamente com escore 10 PS, escore 10 pD e erosões ósseas no US.
- Os níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF e IFN- $\gamma$  e VEGF não foram associados estatisticamente ao DAS28, HAQ, escore 10 PS, escore 10 pD e erosões ósseas no US.
- A concentração plasmática de IL-6 foi associada estatisticamente a DAS28, VSG e contagem de articulações edemaciadas
- A concentração plasmática de IL-6 não foi associada estatisticamente a

presença de erosões ósseas no US.

- A concentração plasmática de IL-6 foi associada estatisticamente a escore 10 pD, pD e PS em punhos. A associação com escore 10 pD ocorreu independente de DAS28.

## 10 PERSPECTIVAS

Novos estudos comparando parâmetros ultrassonográficos articulares com perfis linfocitários e citocinas circulantes serão bem-vindos e poderão confirmar nossos achados. No futuro, a avaliação de perfis linfocitários e de citocinas poderá ser executada no ambiente sinovial. A comparação *in loco* de parâmetros ultrassonográficos com tipos linfocitários e citocinas trará avanços na compreensão da patogênese da AR, com potenciais benefícios terapêuticos.

## **11 FINANCIAMENTO**

Este estudo foi financiado com verba do Fundo de Apoio à Pesquisa da Sociedade de Reumatologia do Rio Grande do Sul.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Firestein G. Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. In: Firestein G, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, editors. *Kelley's textbook of rheumatology*. 9th ed. Philadelphia; 2013. p. 1059–108.
2. Gabriel S. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2001;27:269–81.
3. Marques Neto J, Langen L. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. *Rev Bras Reum*. 1993;33:169–73.
4. Gabriel S, Crowson C, Kremers H, Doran M, Turesson C, O'Fallon W. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 2003;48:54-8.
5. Avina-Zubieta J, Choi H, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile J, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis and Rheum*. 2008;59:1690–7.
6. Drossaers-Bakker K, de Buck M, van Zeben A, Zwinderman H, FC B, Hazes J. Long-term course and outcome of functional capacity in rheumatoid arthritis: the effect of disease activity and radiologic damage over time. *Arthritis and Rheum*. 1999;42:1854–60.
7. O'Dell J. Rheumatoid arthritis. In: Goldman L, Ausiello D, editors. *Cecil textbook of medicine*. 22nd ed. Philadelphia; 2004. p. 1644–54.
8. Arnett F, Edworthy S, Bloch D, McShane D, Fries J, Cooper N, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31:315–24.
9. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong B, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2741–9.
10. Nielen M, van der Horst A, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma I, van de Stadt R, Aarden L. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1199–204.
11. Da Silveira I, Burlingame R, von Muhlen C, Bender A, Staub H. Anti-CCP antibodies have more diagnostic impact than rheumatoid factor (RF) in a population tested for RF. *Clin Rheumatol*. 2007;26:1883–9.

12. Aletaha D, Neogi T, Silman A, Funovits J, Felson D, Bingham C, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis and Rheum.* 2010;62:2569–81.
13. Da Mota L, Cruz B, Brenol C, Pereira I, Rezende-Fronza L, Bertolo M. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reum.* 2012;52:152–74.
14. Prevoo M, van 't Hof M, Kuper H, van Leeuwen M, van de Putte L, van Riel P. 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;38:44–8.
15. Van Gestel A, Haagsma C, van Riel P. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1845–50.
16. Ferraz M, Oliveira L, Araujo P, Atra E, Tugwell P. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. *J Rheumatol.* 1990;17:813–7.
17. Maska L, Anderson J, Michaud K. Measures of functional status and quality of life in rheumatoid arthritis: Health Assessment Questionnaire Disability Index (HAQ), Modified Health Assessment Questionnaire (MHAQ), Multidimensional Health Assessment Questionnaire (MDHAQ), Health Assessment. *Arthritis Care Res.* 2012;2012:11:S4–13.
18. Da Mota L, Cruz B, de Albuquerque C, Gonçalves D, Laurindo I, Pereira I, et al. Update on the 2012 Brazilian Society of Rheumatology Guidelines for the treatment of rheumatoid arthritis: position on the use of tofacitinib. *Rev Bras Reum.* 2015;55:512–21.
19. Stoffer M, Schoels M, Smolen J, Aletaha D, Breedveld F, Burmester G, et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search update. *Ann Rheum Dis.* 2016;75:16-22.
20. Schipper L, van Hulst L, Grol R, van Riel P, Hulsher M, Franssen J. Meta-analysis of tight control strategies in rheumatoid arthritis: protocolized treatment has additional value with respect to the clinical outcome. *Rheumatol.* 2010;49:2154–64.
21. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediat Inflamm.* 2014;2014:492873. Epub 2014 Feb 22.
22. McInnes I, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:429–42.
23. McInnes I, Buckley C, Isaacs J. Cytokines in rheumatoid arthritis — shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12:63–8.



24. Szekanecz Z, Koch A. Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12:5–13.
25. Pickens S, Volin M, Mandelin A, Kolls J, Pope R, Shahrara S. L-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2010;184:3233–41.
26. Van Amelsfort J, Van Roon J, Norrdegraaf M, Jacobs K, Bijlsma J, Lafeber F. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+CD25+ regulatory T cell mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:732-2.
27. Cooles F, Isaacs J, Anderson A. Treg Cells in Rheumatoid Arthritis: An Update. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15:352–61.
28. Suri-Payer E, Amar A, Thornton A, Shevach E. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998;160:1212–8.
29. Sakaguchi S, Salaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155:1151–4.
30. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192:303–10.
31. Mchugh R, Whittters M, Piccirillo C, Young D, Shevach E, Collins M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002;168:5979-83.
32. Liu W, Putnan A, Xu-Yu Z, Szot G, Lee M, Zhu S. CD127 expression inversely correlates with Fox P3 and suppressive function of human CD4+T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203:1701–11.
33. Akbar A, Vukmanovic-Stejić M, Taams L, Macallan D. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:231–7.
34. Maddur M, Miossec P, Kaveri S, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*. 2012;181:8–18.
35. Wang W, Shao S, Jiao Z. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2012;32:887–93.
36. Niu W, Cai B, Huang Z. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2012;32:2731–6.

37. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204:1849–61.
38. Cao D, Van Vollenhoven R. CD25<sup>BRIGHT</sup>CD4<sup>+</sup> Regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther*. 2004;6:355–46.
39. Jiao Z, Wang W, Jia R, Li J, You H, Chen I. Accumulation of FoxP3-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2007;36:28–33.
40. Toubi E, Kessel A, Mahamudv Z, Hallas K, Rosner I. Increased spontaneous apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann NY Sci*. 2005;1051:506–14.
41. Aerts N, Dombrecht E, Ebo D, Bridts C, Stevens W, DeClerck L. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008;251:109–15.
42. Han G, O'Neil-Andersen N, Zurier R, Lawrence D. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008;253:92–101.
43. Kao J, Hsue Y, Lin C. Role of new population of peripheral CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during remissions stages in rheumatoid arthritis patients. *J Microbiol Immunol*. 2007;40:419–27.
44. Van Amessfort J, Jacobs K, Bijlsma J, Lafeber F, Taams L. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2004;50:2775–85.
45. Prakken B, Wehrens E, Van Wijk F. Quality or quantity? Unraveling the role of Treg cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum*. 2013;65:552–4.
46. Lin S, Chen K, Lin C, Kuo C, Ling Q, Chan C. The quantitative analysis of peripheral blood FoxP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:987–96.
47. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4<sup>+</sup>CF25<sup>+</sup> T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005;140:360–7.
48. Van Roon J, Hartgring S, Van Der Wurff-Jacobs K, Bijlsma J, Lafeber F. Numbers of CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells that lack the IL-7 receptor are increased intraarticularly and have impaired suppressive function in RA patients. *Rheumatol*. 2010;8:389–93.
49. Alunno A, Manetti M, Caterbi S, Ibba-Manneschi L, Bistoni O, Bartoloni E, et al. Altered Immunoregulation in Rheumatoid Arthritis: the role of Regulatory T cells

- and Proinflammatory Th 17 cells and Therapeutic Implications. *Mediat Inflamm.* 2015;2015:751793. Epub Mar 30.
50. Bisi M, do Prado A, Rabelo C, Brollo F, da Silveira I, JA M, et al. Articular ultrasonography: interobserver reliability in rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reum.* 2014;54:250–4.
  51. Colebatch A, Edwards C, Østergaard M, van der Heijde D, Balint P, D'Agostino M, et al. EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:804–14.
  52. Ohrndorf S, Backhaus M. Pro musculoskeletal ultrasonography in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2015;33:S50–3.
  53. Døhn U, Terslev L, Szkudlarek M, Hansen M, Hetland M, Hansen A, et al. Detection, scoring and volume assessment of bone erosions by ultrasonography in rheumatoid arthritis: comparison with CT. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:530–4.
  54. Grassi W, Filippucci E, Farina A. Ultrasonography in the evaluation of bone erosions. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:98–103.
  55. Zayat AS, Ellegaard K, Conaghan PG, Terslev L, Hensor EM a, Freeston JE, et al. The specificity of ultrasound-detected bone erosions for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:897-903.
  56. Filippucci E, Iagnocco A, Meenagh G. Ultrasound imaging for the rheumatologist. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:1–5.
  57. Kane D, Bruyn G, Arnold E, Grassi W. A rheumatologist's perspective on musculoskeletal ultrasound in rheumatology: comment on the editorial by Roemer et al. *Arthritis Rheum.* 2006;55:341–2.
  58. Brown A, O'Connor P, Roberts T. Recommendations for musculoskeletal ultrasonography by rheumatologists: setting global standards for best practice by expert consensus. *Arthritis Rheum.* 2005;53:83-92.
  59. Bresnihan B, Kane D. Sonography and subclinical synovitis. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:333–4.
  60. Szkudlarek M, Narvestad E, Klarlund M, Court-Payen M, Thomsen P, Østergaard M. Ultrasonography of the metatarsophalangeal joints in rheumatoid arthritis: comparison with magnetic resonance imaging, conventional radiography and clinical examination. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2103–12.
  61. Wakefield R, Green M, Marzo-Ortega H. Should oligoarthritis be reclassified? Ultrasound reveals a high prevalence of subclinical disease. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:382–5.
  62. Naredo E, Bonilla G, Gamero F, Uson J, Carmona L, Laffon A. Assessment of inflammatory activity in rheumatoid arthritis: a comparative study of clinical

- evaluation with grey scale and power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:375–81.
63. Ogishima H, Tsuboi H, Umeda N, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M. Analysis of subclinical synovitis detected by ultrasonography and low-field magnetic resonance imaging in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2013;24:60-8.
  64. Mendonca J, Yazbek M, Laurindo I, Bertolo M. Wrist ultrasound analysis of patients with early rheumatoid arthritis. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44:11–5.
  65. Damjanov N, Radunovic G, Prodanovic S, Vukovic V, Milic V, Simic Pasalic K. Construct validity and reliability of ultrasound disease activity score in assessing joint inflammation in RA: comparison with DAS-28. *Rheumatol.* 2012;51:120–8.
  66. Xiao H, Liu M, Liao X, Li Y, Gao J, Li F, et al. Value of ultrasonography for diagnosis of synovitis associated with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2014;17:767–75.
  67. Brown K, Quinn M, Karim Z, Conaghan P, Peterfy C, Hensor E, et al. Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: evidence from an imaging study may explain structural progression. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3761–73.
  68. Peluso G, Michelutti A, Bosello S, Gremese E, Toluso B, Ferraccioli G. Clinical and ultrasonographic remission determines different changes of relapse in early and long standing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:172–5.
  69. Gärtner M, Mandl P, Radner H, Supp G, Machold K, Aletaha D, et al. Sonographic joint assessment in rheumatoid arthritis: associations with clinical joint assessment during a state of remission. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2005–14.
  70. Brown A, Conaghan P, Karim Z, Quinn M, Ikeda K, Peterfy C, et al. An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2958–67.
  71. Dougados M, DEvauchelle-Pensec V, Ferlet J, Jousse-Joulin S, D'Agostino M, Backhaus M. The ability of synovitis to predict structural damage in rheumatoid arthritis: a comparative study between clinical examination and ultrasound. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:665–71.
  72. Yoshimi R, Hama M, Takase K, Ihata A, Kishimoto D, Terauchi K, et al. Ultrasonography is a potent tool for the prediction of progressive joint destruction during clinical remission of rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2013;23:456–65.
  73. Scirè C, Montecucco C, Codullo V, Epis O, Todoerti M, Caporali R. Ultrasonographic evaluation of joint involvement in early rheumatoid arthritis in clinical remission: power Doppler signal predicts short-term relapse. *Rheumatol.* 2009;48:1092–7.

74. Foltz V, Gandjbakhch F, Etchepare F, Rosenberg C, Tanguy M, Rozenberg S, et al. Power Doppler Ultrasound, but Not Low-Field Magnetic Resonance Imaging, Predicts Relapse and Radiographic Disease Progression in Rheumatoid Arthritis Patients With Low Levels of Disease Activity. *Arthritis Rheum.* 2012;64:67–76.
75. Naredo E, Valor L, De la Torre I, Montoro M, Bello N, Martinez-Barrio J, et al. Predictive value of Doppler ultrasound-detected synovitis in relation to failed tapering of biologic therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2015;54:1408-14.
76. Saleem B, Brown A, Quinn M, Karim Z, Hensor E, Conaghan P, et al. Can flare be predicted in DMARD treated RA patients in remission, and is it important? A cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1316–21.
77. Iwamoto T, Ikeda K, Hosokawa J, Yamagata M, Tanaka S, Norimoto A, Sanayama Y, Nakagomi D, et al. Prediction of relapse after discontinuation of biologic agents by ultrasonographic assessment in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission: high predictive values of total gray-scale and power Doppler scores that represent residual synovial. *Arthritis Care Res.* 2014;66:1576–81.
78. Marks J, Holroyd C, Dimitrov B, Armstrong R, Calogeras A, Cooper C, et al. Does combined clinical and ultrasound assessment allow selection of individuals with rheumatoid arthritis for sustained reduction of anti-tumor necrosis factor therapy? *Arthritis Care Res.* 2015;67:746–53.
79. Nguyen H, Ruysse-Witrand A, Gandjbakhch F, Constantin A, Foltz V, Cantagrel A. Prevalence of ultrasound-detected residual synovitis and risk of relapse and structural progression in rheumatoid arthritis patients in clinical remission: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology.* 2014;53:2110–8.
80. Gärtner M, Alasti F, Supp G, Mandl P, Smolen J, Aletaha D. Persistence of subclinical sonographic joint activity in rheumatoid arthritis in sustained clinical remission. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:2050–3.
81. Dale J, Purves D, McConnachie A, McInnes I, Porter D. Tightening up? Impact of musculoskeletal ultrasound disease activity assessment on early rheumatoid arthritis patients treated using a treat to target strategy. *Arthritis Care Res.* 2014;66:19–26.
82. Rezaei H, Torp-Pedersen S, af Klint E, Backheden M, Kisten Y, Gyori N, et al. Diagnostic utility of musculoskeletal ultrasound in patients with suspected arthritis - a probabilistic approach. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:448–55.
83. Ceponis A, Onishi M, Bluestein H, Kalunian K, Townsend J, Kavanaugh A. Utility of the ultrasound examination of the hand and wrist joints in the management of established rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 2014;66:236–44.
84. Haavardsholm E, Aga A, Olsen I, Hammer H, Uhlig T, Fremstad H, et al. Aiming for Remission in Rheumatoid Arthritis: Clinical and Radiographic Outcomes from a Randomized Controlled Strategy Trial Investigating the Added Value of

- Ultrasonography in a Treat-to-Target Regimen [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67 (suppl 10).
85. Mandl P, Naredo E, Wakefield R, Conaghan P, D'Agostino M, OMERACT Ultrasound Task Force., et al. A systematic literature review analysis of ultrasound joint count and scoring systems to assess synovitis in rheumatoid arthritis according to the OMERACT filter. *J Rheumatol.* 2011;38:2055–62.
  86. Backhaus M, Ohrndorf S, Kellner H, Strunk J, Backhaus T, Hartung W. Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practise: a pilot project. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1194–201.
  87. Backhaus T, Ohrndorf S, Kellner H, Strunk J, Hartung W, Sattler H, et al. The US7 score is sensitive to change in a large cohort of patients with rheumatoid arthritis over 12 months of therapy. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:1163–9.
  88. Yoshimi R, Ihata A, Kunishita Y, Kishimoto D, Kamiyama R, Minegishi K, et al. A novel 8-joint ultrasound score is useful in daily practice for rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2015;25:379–85.
  89. Zufferey P, Brulhart L, Tamborrini G, Finckh A, Scherer A, Moller B, et al. Ultrasound evaluation of synovitis in RA: correlation with clinical disease activity and sensitivity to change in an observational cohort study. *Jt Bone Spine.* 2014;81:222–7.
  90. Aga A, Lie E, Olsen I, Hammer H, Uhlig T, van der Heijde D, et al. Development of an Ultrasound Joint Inflammation Score for Rheumatoid Arthritis through a Data-Driven Approach [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67 (suppl 10) .
  91. Leng X, Xiao W, Xu Z, Zhu X, Liu Y, Zhao D, et al. Ultrasound7 versus ultrasound12 in monitoring the response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2016. Epub 2016 Jan 19.
  92. Kitchen J, Kane D. Greyscale and power Doppler ultrasonographic evaluation of normal synovial joints: correlation with pro- and anti-inflammatory cytokines and angiogenic factors. *Rheumatol.* 2015;54:458–62.
  93. Ramirez J, Ruiz-Esquide V, Pomes I, Celis R, Cuervo A, Hernandez M, et al. Patients with rheumatoid arthritis in clinical remission and ultrasound-defined active synovitis exhibit higher disease activity and increased serum levels of angiogenic biomarkers. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R5.
  94. Gullick N, Evans H, Church L, Javaraj D, Filer A. Linking Power Doppler Ultrasound to the Presence of Th17 Cells in the Rheumatoid. *PLoS ONE.* 2010;5:e 12516.
  95. Fazaa A, Ben Abdelghani K, Abdeladhim M, Laatar A, Ben Ahmed M, Zakraoui L. The level of interleukin-17 in serum is linked to synovial hypervascularization in rheumatoid arthritis. *Jt Bone Spine.* 2014;81:550–1.

96. BAILLET A, GOSSEC L, PATERNOTTE S, ETCHETO A, COMBE B, MEYER O, et al. Evaluation of Serum Interleukin-6 Level as a Surrogate Marker of Synovial Inflammation and as a Factor of Structural Progression in Early Rheumatoid Arthritis: Results From a French National Multicenter Cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015;67:905–12.
97. Ball E, Gibson D, Rooney AB. Plasma IL-6 levels correlate with clinical and ultrasound measures of arthritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2014;23:46–56.
98. Fransen J, van Riel P. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:S93–9.
99. Van der Heijde D, van 't Hof M, van Riel P, Theunisse L, Lubberts E, van Leeuwen 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*. 1990;49:916–20.
100. Bruce B, Fries J. The Health Assessment Questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:S14–8.
101. Wakefield R, Balint P, Szkudlarek M, Fillipucci E, Backhaus M, D'Agostino M. OMERACT 7 Special Interest Group. Musculoskeletal ultrasound including definitions for ultrasonographic pathology. *J Rheumatol*. 2005;32:2485–7.
102. Ranzolin A, Brenol J, Bredemeier M, Guarienti J, Rizzatti M, Feldman D, et al. Association of concomitant fibromyalgia with worse disease activity score in 28 joints, health assessment questionnaire, and short form 36 scores in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61:794–800.
103. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Education and Psychological Measurement*. 1960;20:37–46.
104. Louzada-Junior P, Souza B, Toledo R, Ciconelli R. Descriptive analysis of the demographical and clinical characteristics of the patients with rheumatoid arthritis in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Reum*. 2007;47:84–90.
105. Chakr R, Mendonça J, Bonfiglioli K, Moss I, Luz K, Laurindo I. Targeted-ultrasound initiative in Brazil: access and barriers to ultrasound dissemination in clinical practice. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:1305.
106. Brown A, Roberts T, O'connor P, Wakefield R, Karim Z, Emery P. The development of an evidence-based educational framework to facilitate the training of competent rheumatologist ultrasonographers. *Rheumatol*. 2007;46:391-7.
107. Backhaus M, Burmester G-R, Gerber T, Grassi W, Machold P, Swen W, et al. Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatology. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:641-9.

108. Da Luz K. Prospective evaluation of ultrasound features of wrists and metacarpophalangeal joints in early rheumatoid arthritis. Universidade Federal de São Paulo; 2012.
109. Joulin S, D'Agostino M, Marhadour T, Albert J, Bentin J, Valckenaere I, et al. Reproducibility of joint swelling assessment by sonography in patients with long-lasting rheumatoid arthritis (SEA-Repro study part II). *J Rheumatol.* 2010;37:938–45.
110. Le Boedec M, Jousse-Joulin S, Ferlet JF, Marhadour T, Chales G GL. Factors influencing concordance between clinical and ultrasound findings in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2013;40:244–52.
111. Gardiner P, Bell A, Taggart A, Wright G, Kee F, Smyth A, et al. A potential pitfall in the use of the Disease Activity Score (DAS28) as the main response criterion in treatment guidelines for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:506–7.
112. Inanc N, Yilmaz-Oner S, Can M, Sokka T, Direskeneli H. The role of depression, anxiety, fatigue, and fibromyalgia on the evaluation of the remission status in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2014;41:1755–60.
113. Da Silva Chakr R, Brenol J, Behar M, Mendonça J, Kohem C, Monticelo O, et al. Is ultrasound a better target than clinical disease activity scores in Rheumatoid Arthritis with Fibromyalgia? A Case-Control Study. *PLoS One.* 2015;4:e0118620.
114. Wolfe F, Michaud K, Busch R, Katz R, Rasker J, Shahouri S, et al. Polysymptomatic distress in patients with rheumatoid arthritis: understanding disproportionate response and its spectrum. *Arthritis Care Res.* 2014;66:1465–71.
115. Couvoisier D, Agoritsas T, Glauser J, Michaud K, Wolfe F, Cantoni E. Pain as an Important Predictor of Psychosocial Health in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64:190-6.
116. Harth M, Pope J. The measure of our measures. *Rheumatol.* 2004;43:1465–7.
117. Szkudlarek M, Narvestad E, Klarlund M, Court-Payen M, Thomsen HS, Østergaard M. Ultrasonography of the metatarsophalangeal joints in rheumatoid arthritis: comparison with magnetic resonance imaging, conventional radiography, and clinical examination. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2103–12.
118. Wakefield RJ, Green M, Marzo-Ortega H, Conaghan PG, Gibbon W, McGonagle DG. Should oligoarthritis be reclassified? Ultrasound reveals a high prevalence of subclinical disease. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:382–5.
119. Naredo E, Bonilla G, Gamero F, Uson J, Carmona L, Laffon A. Assessment of inflammatory activity in rheumatoid arthritis: a comparative study of clinical evaluation with grey scale and power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:375–81.



120. Shimamoto K, Ito T, Ozaki Y, Amuro H, Tanaka A, Nishizawa T, et al. Serum interleukin 6 before and after therapy with tocilizumab is a principal biomarker in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2013;40:1074–81.
121. Brzustewicz E, Bryl E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis – Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine*. 2015;76:527–36.
122. Andersen M, Boesen M, Ellegaard K, Christensen R, Söderström K, Sjøe N, et al. Synovial explant inflammatory mediator production corresponds to rheumatoid arthritis imaging hallmarks: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther*. 2014;16:R107.
123. Ceccarelli F, Perricone C, Fabris M, Alessandri C, Iagnocco A, Fabro C, et al. Transforming growth factor b 869C/T and interleukin 6 -174G/C polymorphisms relate to the severity and progression of bone-erosive damage detected by ultrasound in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:R111.
124. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine: 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:1–21.
125. Niu X, Chen G. Clinical biomarkers and pathogenic-related cytokines in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res*. 2014;2014:698192. Epub 2014 Aug 21.

## ANEXOS

## Anexo A - Termo de Aprovação do Comitê Científico



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
FACULDADE DE MEDICINA  
COMISSÃO CIENTÍFICA

## PARECER DO RELATOR

1. **Título:** adequado, claro, conciso?

O título "PROJETO CITUS-Treg: Dano Estrutural Articular por Ultrassonografia em Artrite Reumatóide e sua correlação com citocinas inflamatórias e linfócitos T regulatórios no sangue periférico" da a idéia que o dano estrutural foi causado pela ultrassonografia. Sugiro revisar o título (... avaliado por ... ?, detectado por ....?, Avaliação de dano estrutural com ultrassonografia em .....?, Outro???)

2. **Introdução:** fundamentação, justificativa e relevância adequadas e pertinentes? Hipótese é apresentada?

Fundamentação adequada e hipóteses apresentadas

3. **Objetivos:** claros e adequados?

Sim

4. **Métodos**

a. **Delineamento:** clareza, mascaramento,...

Adequado

b. **Pacientes ou material:** critérios de inclusão e exclusão, fatores de confusão,...

Adequado

c. **Aferição das variáveis:** limitações, subjetividade,...

Adequado

d. **Estatística:** cálculo do tamanho da amostra, valor de p, poder, testes estatísticos,...

Apresentado informação do tamanho amostral.

5. **Referências bibliográficas:** revisão da literatura, estudos prévios relevantes,...

Adequado

*BRE*  
Barbara Breina Pinheiro da Costa  
Coordenadora da Comissão Científica  
FAMED - HSL - PUCRS

6. **Avaliação final**

a. Aprovado  06.06.13

b. Retornar com modificações para avaliação

c. Reprovado

• **Questões específicas** (em caso de retorno para modificações):

O trabalho está adequado, mas sugiro reisar o título, após revisão do título o trabalho pode ser aprovado

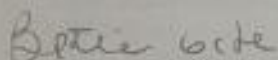
Porto Alegre, 06 de junho de 2013.

Senhor(a) Pesquisador(a)

A Comissão Científica da Faculdade de Medicina e do Hospital São Lucas da PUCRS avaliou e aprovou seu projeto de pesquisa intitulado "PROJETO CITUS-Treg: Dano Estrutural Articular por Ultrassonografia em Artrite Reumatóide e sua correlação com citocinas inflamatórias e linfócitos T regulatórios no sangue periférico".

O projeto, assim como todos os documentos que o acompanharam, os quais receberam a presente aprovação, devem ser submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS através da Plataforma Brasil nas mesmas versões apresentadas a esta Comissão.

Atenciosamente,



Profª Bartira E. Pinheiro da Costa  
Coordenador da Comissão Científica  
FAMED-HSL/PUCRS

Ilmo Sr

Prof Dr Henrique Staub

Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa

**PUCRS**

**FACULDADE DE MEDICINA - HSL/PUCRS**  
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - 3º andar - CEP 90610-000  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3304 - Fax (51) 3320-3040  
E-mail: [nudem@pucrs.br](mailto:nudem@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/medicina](http://www.pucrs.br/medicina)

## Anexo B - Termo de Aprovação do Comitê de Ética e Registro Plataforma Brasil

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PROJETO CITUS-Treg: Dano Estrutural Articular Avaliado por Ultrassonografia em Artrite Reumatóide e sua correlação com citocinas inflamatórias e linfócitos T regulatórios no sangue periférico.

**Pesquisador:** Henrique Luiz Staub

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 18886313.3.0000.5336

**Instituição Proponente:** UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 425.110

**Data da Relatoria:** 26/09/2013

#### Apresentação do Projeto:

O projeto visa avaliar a correlação, na artrite reumatóide grave, entre avaliação ultrassonográfica das mãos com exames sanguíneos de citocinas e células T.

#### Objetivo da Pesquisa:

Comparação entre dados de ultrassonografia e células T e citocinas na artrite reumatóide.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo de uma amostra de sangue venoso e tempo de 2 horas de exame de ultrassom.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo realizado face as comparações anteriores serem com o Rx convencional.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

#### Recomendações:

Pendência resolvida quanto ao termo de consentimento, porém lembrar que devem constar as assinaturas do participante e do pesquisador em todas as páginas.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência resolvida.

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681  
**Bairro:** CEP: 90.619-900  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)320-3345 **Fax:** (51)320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 425.110

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PORTO ALEGRE, 15 de Outubro de 2013

---

**Assinador por:**  
caio coelho marques  
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681  
Bairro: CEP: 90.619-900  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)320-3345 Fax: (51)320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

**Anexo C – Artigo submetido e aceito para publicação com dados parciais do projeto  
com carta de confirmação do aceite e artigo em inglês**

**Date:** Sep 29 2015 7:30:20:267AM  
**To:** "Aline Defaveri do Prado" adprado@gmail.com  
**From:** "H. Ralph Schumacher, Editor, J Clin Rheum " jclinrhe@mail.med.upenn.edu  
**Subject:** JCR Decision

Sep 29 2015 07:29:56:935AM

RE: JCR-15-310R1, entitled "ABSENCE OF ASSOCIATION OF JOINT TENDERNESS AND HIGH RESOLUTION ULTRASOUND FINDINGS IN ESTABLISHED RHEUMATOID ARTHRITIS"

Dear Mrs. do Prado,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the JCR: Journal of Clinical Rheumatology.

If you have not done so, please submit a copyright transfer form. Go to the JCR Website ([www.jclinrheum.com](http://www.jclinrheum.com)) and download the form and fax to 215-823-6032.

Thank you for contributing your article to the JCR: Journal of Clinical Rheumatology.

The JCR is a peer-reviewed semiquarterly journal listed on Medline and dedicated to the study of rheumatologic and musculoskeletal diseases. Each issue contains original articles, case reports, reviews, expert commentary, letters to the editors and more, providing useful clinical information to practicing clinicians, like you.

We encourage you to subscribe yourself and check if your group's/hospital's/institution's library subscribes to the JCR. Go to our website [www.jclinrheum.com](http://www.jclinrheum.com) home page and click on "New Subscription" and subscribe to find the latest practical reports on diagnosis and patient management issues.

You will be receiving proofs approximately 2 months prior to the publication date from the publisher with directions on returning them. Please check proofs very carefully, as copy editors have been known to misinterpret words or phrases. Please return the proofs within 48 hours so as not to delay publication.

**OPEN ACCESS**

If you indicated in the revision stage that you would like your submission, if accepted, to be made open access, please go directly to step 2. If you have not yet indicated that you would like your accepted article to be open access, please follow the steps below to complete the process:

1. Notify the journal office via email that you would like this article to be available open access. Please send your Email to [jclinrhe@mail.med.upenn.edu](mailto:jclinrhe@mail.med.upenn.edu). Please include your article title and manuscript number.
2. A License to Publish (LTP) form must be completed for your submission to be made available open access. Please download the form from <http://links.lww.com/LWW-ES/A49>, sign it, and Email the completed form to the journal office.
3. **Within 48 hours of receiving this e-mail:** Go to <http://wolterskluwer.qconnect.com> to pay for open access. You will be asked for the following information. Please enter exactly as shown:
  - a. Article Title - ABSENCE OF ASSOCIATION OF JOINT TENDERNESS AND HIGH RESOLUTION ULTRASOUND FINDINGS IN ESTABLISHED RHEUMATOID ARTHRITIS
  - b. Manuscript Number - JCR-15-310R1

Thank you for allowing us to publish your interesting and important work in the JCR.

<http://jcr.edmgr.com/>

Your username is: \*\*\*\*\*

Your password is: \*\*\*\*\*

With Kind Regards,

Dr. H. Ralph Schumacher, Jr.  
 Editor-in-Chief  
 JCR: Journal of Clinical Rheumatology

**Association of clinical examination with gray scale and power Doppler  
ultrasonography in established rheumatoid arthritis.**

Aline Defaveri do Prado (do Prado AD)<sup>1,2</sup>, Melissa Cláudia Bisi (Bisi MC)<sup>1</sup>, Deise Marcela Piovesan (Piovesan DM)<sup>1</sup>, Markus Bredemeier (Bredemeier M)<sup>2</sup>, Inês Guimarães da Silveira (Silveira IG)<sup>1</sup>, José Alexandre Mendonça (Mendonça JA)<sup>3</sup>, Henrique Luiz Staub (Staub HL)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rheumatology Unit, Hospital Sao Lucas da Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup>Rheumatology Unit, Grupo Hospital Conceição (GHC), Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Rheumatology Unit, Hospital da Pontificia Universidade Católica (PUC) de Campinas, Campinas, Brazil.

## INTRODUCTION

High-resolution musculoskeletal ultrasound (MSUS) enables assessment of intraarticular abnormalities in rheumatoid arthritis (RA). MSUS allows early detection of bone damage and synovial proliferation through gray scale [GSS] images, as well as circulatory abnormalities via power Doppler (pD) signal. We herein averiguate the association of clinical examination with GSS and pD in the hands of patients with established RA.

## METHODS

Eighty-four RA patients (according to the 1987 American College of Rheumatology criteria) treated with non-biologic disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) were included in this cross-sectional study. A Rheumatologist unaware of ultrasound findings carried out physical examination of the hands (pain and/or edema). MSUS – MyLab 60, Esaote, Genova, Italy, linear probe 6-18 MHz – was performed on the wrists, 2<sup>th</sup> and 3<sup>th</sup> metacarpophalangeal (MCP) and 2<sup>th</sup> and 3<sup>th</sup> proximal interphalangeal (PI) joints of both hands by two ultrasound-trained Rheumatologists (unaware of clinical data) immediately after physical examination. GSS and pD were evaluated using a semi-quantitative scale ranging from 0 to 3 as described in previous studies (1). The sum of individual joint scores for GSS and pD (10-joint score) was calculated and utilized to correlate with clinical variables. Presence of bone erosions was

defined according to the OMERACT criteria (2). Disease activity and disability were measured using DAS28 and Health Assessment Questionnaire (HAQ), respectively.

Considering the non-normality of distribution of dependent and independent variables, Mann-Whitney test and Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ) were used for statistical analysis.  $P$  values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant. Interrater agreement was tested using the weighted  $kappa$  statistic.

## RESULTS

Patients clinical and demographic features were: mean age,  $55.6 \pm 11.8$  years; female gender, 79%; Caucasians, 85.7%; positive rheumatoid factor, 63%; median (interquartile range) disease duration 6 (2-13) years; mean  $\pm$  standard deviation (SD) DAS28,  $4.55 \pm 1.62$ ; mean  $\pm$  SD HAQ score,  $1.13 \pm 0.87$ . Interobserver agreement ( $kappa$ ) for US features varied from 0.53 to 1.0. Intraclass correlation for GSS score was 0.964 (95% Confidence Interval 0.899-0.986,  $P < 0.000$ ) and for pD score was 0.859 (95% Confidence Interval 0.646-0.941,  $P < 0.000$ ).

There was a significant association ( $P \leq 0.05$ ) of edema with higher GSS and pD in all individual joints, except for the 3<sup>rd</sup> right PI. No association of pain on joint palpation with GSS ( $r_s = -0.071$   $P = 0.524$ ) or pD ( $r_s = -0.196$   $P = 0.078$ ) in any of the evaluated joints were observed. There was no significant correlation of 10-joint GSS- and pD scores with DAS28 ( $r_s = 0.21$ ,  $P = 0.060$  and  $r_s = 0.04$ ,  $P = 0.722$ , respectively), HAQ score ( $r_s = -0.02$ ,  $P = 0.862$  and  $r_s = 0.00$ ,  $P = 0.997$ ), and tender joint count ( $r_s = 0.07$ ,  $P = 0.564$  and  $r_s = -0.20$ ,  $P = 0.078$ ). We found a correlation of 10-joint GSS and pD scores with the total swollen joint count ( $r_s = 0.54$ ,  $P < 0.001$  and  $r_s = 0.39$ ,  $P < 0.001$ ; figures 1 and 2, respectively).

Consistent with the findings of 10-joint GSS and pD scores, there was an association of at least one bone erosion in any of the included joints with the number of swollen joints ( $P < 0.001$ ; figure 3), but not with tender joint count ( $P = 0.248$ ).

## DISCUSSION

In studies including early RA patients, MSUS was more sensitive than physical examination for detection of synovitis (3); MSUS has also shown subclinical synovitis in patients with clinical remission (4). Other group of authors postulated that subclinical pD



signal was predictor of structural damage, i.o., erosion (5). Especially in established RA patients, physical examination may be misleading. It has been shown that, in longstanding disease, joint count may be biased by deformities (6,7) and that widely used composite scores as DAS28 miss accuracy in patients with fibromyalgia and RA (8).

The best global MSUS score to evaluate synovitis has not been defined in the literature yet, being a matter of discussion. Backhaus et al used a 7-joint score (evaluating 5 hand and 2 foot joints) to summarize MSUS findings in RA in daily clinical practice. The 7-joint score reflected disease activity and response to treatment and was the first score describing inflammatory and erosive ultrasound abnormalities (9). We herein set up to utilize a MSUS score that included exclusively hand joints (the MSUS 10-joint score), an instrument previously employed to assess ultrasound abnormalities in early RA (10).

In the current study, 10-joint GSS and pD scores did not correlate with clinical measurements of disease activity and disability. Edema on physical examination did correlate with US alterations. Interestingly, pain was not associated with global ultrasound findings. Knowingly, inflammatory activity is overestimated when using DAS28 as a measure of disease activity in patients with fibromyalgia associated with RA (11).

A recent report also disclosed no association of ultrasound findings with DAS28 in patients with RA and fibromyalgia (12). Wolfe and colleagues reasserted that MSUS is useful for detecting true inflammatory activity in RA patients with fibromyalgia; they also sustained that composite measures used to assess RA are flawed as they confound RA inflammation with patient distress (13). Perception of pain is highly subjective and may be influenced by a number of variables, including socio-cultural factors (14). As it occurs in fibromyalgia, pain may not reflect isolated inflammation in established RA. On the other hand, we observed correlation of joint swelling with synovial proliferation (GSS), microcirculatory Doppler signal (pD), and bone erosions. Altogether, these findings suggest that joint enlargement in established RA is more closely related to disease activity and joint destruction than to tenderness.

Worthy of note, structural progression of RA has been closely associated with swollen joint count but not with pain (18-19). Dougados et al. reported that persistent synovitis (simultaneous presence of joint edema, synovial proliferation and pD signal on

US examination) related to structural deterioration in RA patients (15). Our findings reinforce that joint tenderness may mislead the evaluation of RA activity, once it did not correlate with objective inflammatory signs and structural parameters seen on MSUS.

## CONCLUSION


Our data show that articular edema on physical examination associates with proliferative synovitis, microcirculatory changes and bone erosions as seen on MSUS of RA patients with established disease. Isolated pain does not appear to reflect inflammatory ultrasound abnormalities or structural damage in this group of patients.

## REFERENCES



1. Naredo E, Bonilla G, Gamero F, Uson J, Carmona L, Laffon A. Assessment of inflammatory activity in rheumatoid arthritis: a comparative study of clinical evaluation with grey scale and power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(3):375–81.
2. Wakefield R, Balint P, Szkudlarek M, Fillipucci E, Backhaus M, D'Agostino M. OMERACT 7 Special Interest Group. Musculoskeletal ultrasound including definitions for ultrasonographic pathology. *J Rheumatol*. 2005;32(12):2485–7.
3. Szkudlarek M, Narvestad E, Klarlund M, Court-Payen M, Thomsen P, Østergaard M. Ultrasonography of the metatarsophalangeal joints in rheumatoid arthritis: comparison with magnetic resonance imaging, conventional radiography and clinical examination. *Arthritis Rheum*. 2004;50(4):2103–12.
4. Brown K, Quinn M, Karim Z, Conaghan P, Peterfy C, Hensor E, et al. Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: evidence from an imaging study may explain structural progression. *Arthritis Rheum*. 2006;54(12):3761–73.
5. Brown A, Conaghan P, Karim Z, Quinn M, Ikeda K, Peterfy C, et al. An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(10):2958–67.
6. Joulin S, D'Agostino M, Marhadour T, Albert J, Bentin J, Valckenaere I, et al. Reproducibility of joint swelling assessment by sonography in patients with long-lasting rheumatoid arthritis (SEA-Repro study part II). *J Rheumatol*. 2010;37(5):938–45.
7. Le Boedec M, Jousse-Joulin S, Ferlet JF, Marhadour T, Chales G GL. Factors influencing concordance between clinical and ultrasound findings in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2013;40(3):244–52.
8. Ranzolin A, Brenol J, Bredemeier M, Guarienti J, Rizzatti M, Feldman D, et al. Association of concomitant fibromyalgia with worse disease activity score in 28 joints, health assessment questionnaire, and short form 36 scores in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61(6):794–800.


9. Backhaus M, Ohrndorf S, Kellner H, Strunk J, Backhaus T, Hartung W. Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practise: a pilot project. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1194–201.
10. Da Luz K. Prospective evaluation of ultrasound features of wrists and metacarpophalangeal joints in early rheumatoid arthritis. Universidade Federal de São Paulo; 2012.
11. Inanc N, Yilmaz-Oner S, Can M, Sokka T, Direskeneli H. The role of depression, anxiety, fatigue, and fibromyalgia on the evaluation of the remission status in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2014;41(9):1755–60.
12. Da Silva Chakr R, Brenol J, Behar M, Mendonça J, Kohem C, Monticielo O, et al. Is ultrasound a better target than clinical disease activity scores in Rheumatoid Arthritis with Fibromyalgia? A Case-Control Study. *PLoS One.* 2015;4(10):e0118620.
13. Wolfe F, Michaud K, Busch R, Katz R, Rasker J, Shahouri S, et al. Polysymptomatic distress in patients with rheumatoid arthritis: understanding disproportionate response and its spectrum. *Arthritis Care Res.* 2014;66(10):1465–71.
14. Couvoisier D, Agoritsas T, Glauser J, Michaud K, Wolfe F, Cantoni E. Pain as an Important Predictor of Psychosocial Health in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(2): 190-6.
15. Dougados M, DEvauchelle-Pensec V, Ferlet J, Jousse-Joulin S, D'Agostino M, Backhaus M. The ability of synovitis to predict structural damage in rheumatoid arthritis: a comparative study between clinical examination and ultrasound. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(5):665–71.

## Anexo D - Comprovante de Submissão e artigo principal em inglês


 The Official Journal of the International Cytokine Society

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Contact us  Help 


 Maintenance outage on 14 February 2016 ... [more](#)  
 'My EES Hub' available for consolidated users ... [more](#)

Username: [adprado@gmail.com](mailto:adprado@gmail.com)  
 Switch To: [Author](#) Go to: [My EES Hub](#)

Version: [EES 2016.1](#)

### Submissions Being Processed for Author Aline Defaveri do Prado, MD, MSc

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	CYTO-16-52	Ultrasound power Doppler synovitis is associated with plasma IL-6 in established rheumatoid arthritis	2016-01-27 02:11:11	2016-02-08 15:01:57	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

## Ultrasound power Doppler synovitis is associated with plasma IL-6 in established rheumatoid arthritis

Aline Defaveri do Prado<sup>1,2</sup>, MD, MSc; Melissa Cláudia Bisi<sup>1</sup>, MD, MSc; Deise Marcela Piovesan<sup>1</sup>, MD; Markus Bredemeier, MD, MSc, PhD<sup>2</sup>; Talita Siara Batista<sup>3</sup>, BSc; Laura Petersen<sup>3</sup>, MSc; Moises Evandro Bauer<sup>3</sup>, PhD; Inês Guimarães da Silveira<sup>1</sup>, MD, MSc, PhD; José Alexandre Mendonça<sup>4</sup>, MD, MSc, PhD; Henrique Luiz Staub<sup>1</sup>, MD, MSc, PhD.

<sup>1</sup> Rheumatology Unit, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre – RS, Brazil.

<sup>2</sup> Rheumatology Unit, Hospital Nossa Senhora da Conceição – Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Porto Alegre – RS, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre – RS, Brazil;

<sup>4</sup> Rheumatology Unit. Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCAMP), Campinas – SP, Brazil.

### Abstract

**BACKGROUND AND OBJETIVE:** Cytokines have an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). Although plasma levels of IL-6 have been related to musculoskeletal ultrasound (MSUS) synovitis in early DMARD-naïve RA, there are no similar studies in established disease. **METHODS:** 64 RA patients treated with non-biological DMARDs and 30 healthy controls were included in this prospective cross-sectional study. A blood sample was taken before evaluation of disease activity (DAS28) and ultrasonography (all tests performed in a blinded fashion). MSUS was performed by one of two ultrasound-trained rheumatologists on 10 joints of both hands. Gray scale (GS) and pD (power Doppler) synovitis were evaluated using a semi-quantitative scale (0-3) in individual joints, and their sum (score 10) was calculated. Plasma cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF, IFN- $\gamma$ , and VEGF) were quantified by flow cytometry. **RESULTS:** Levels of all cytokines, excepting VEGF, were significantly higher in RA patients than in controls ( $P \leq 0.05$ ). In RA patients, IL-6, but not other cytokines, correlated positively with DAS28 and swollen joint count ( $P \leq 0.01$ ), as well as with 10-joint pD score, and GS and pD of both wrists ( $P < 0.01$  for all tests). In multiple linear regression, the association of IL-6 with 10-joint pD score was maintained even after adjustment for DAS28. However, there was no correlation of IL-6 with tender joint count, 10-joint GS score, or presence of erosions. **CONCLUSION:** We demonstrated an association of inflammatory findings on MSUS and plasma IL-6 independently of DAS28 in established RA.

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic autoimmune disease characterized by symmetrical polyarthritis leading to synovial proliferation, pannus formation, bone erosions and articular deformities (1). Cytokines, specially TNF- $\alpha$  and interleukins (IL), play a major role in the development and progression of the disease. Biologic agents targeting cytokines, such as anti-TNF and anti-IL-6 agents, have generated a major impact in the treatment and changed the course of RA (2–4).

In the last decades, high-resolution musculoskeletal ultrasound (MSUS) has been increasingly used in clinical rheumatology practice worldwide, as it has demonstrated consistent and reproducible results among trained rheumatologists (5). Classically, synovial proliferation seen on gray scale (GS) and synovial power Doppler (pD) signal are hallmarks of inflammatory articular disease. Consensual recommendations for the use of MSUS in the management of RA patients have been proposed (6), and its usefulness for the detection of subclinical synovitis, RA relapse and structural progression has been recently demonstrated (7,8).

We are not aware of any published studies on the associations of plasma cytokines with MSUS inflammatory findings in established RA so far. Here, we investigated the associations of plasma cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF, IFN- $\gamma$ , and vascular endothelial growth factor - VEGF) with MSUS abnormalities in a group of established RA individuals treated with non-biologic disease-modifying drugs.

## Patients and Methods

RA outpatients (classified according to the 1987 American College of Rheumatology criteria) treated exclusively with non-biologic disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) were consecutively included in this prospective cross-sectional study. A blood sample was taken just before clinical and ultrasonographic evaluation. A single Rheumatologist (DMP) evaluated disease activity using the Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) (9) and applied the Health Assessment Questionnaire (HAQ) (10) before MSUS. Community-dwelling healthy individuals were also recruited as control group (with demographic features matching those of the patients). The local ethics committee approved the study and all individuals signed a written informed consent.

MSUS examination was performed using a high resolution machine (MyLab 60, Esaote, Genova, Italy) and a linear high-frequency probe (6-18 MHz) by one of two ultrasound-trained rheumatologists (ADP and MBC) unaware of clinical data. The following sites were examined: dorsal aspect of the wrists, 2<sup>th</sup> and 3<sup>th</sup> metacarpophalangeal (MCP) and volar aspect of 2<sup>th</sup> and 3<sup>th</sup> proximal interphalangeal (PIP) joints of both hands. PD frequency was 10-12 MHz, pulse repetition frequency (PRF) varied from 0.5 to 0.7, and the gain was adjusted until disappearance of artifacts, with low wall filter. A proper amount of gel was placed on the skin in order to avoid compression of vessels. GS and pD were searched using a semi-quantitative scale (0-3) as described in previous studies (11). Presence of bone erosions was defined according to OMERACT criteria and were classified as present or absent (12). The sums of the individual joint scores for GS and pD (10-joint GS or pD score) were calculated and used to correlate with clinical and laboratory data.

All blood samples were collected at 8:00 AM and clinical and ultrasound evaluations were performed in the morning, between 8:30 and 11:00 AM. Plasma was immediately stored at -80°C. Cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF, IFN- $\gamma$  and VEGF) were quantified by flow cytometry using the Cytometric Bead Array kit (CBA; BD Biosciences) according to the manufacturer instructions. Cytokines levels were determined using FCAP array software (BD Bioscience).

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS for Windows, version 20.0. Quantitative variables were graphically and statistically tested (with the Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit test) for normality of distribution. Whenever possible, non-normal variables were logarithmically transformed to allow the use of parametric tests. Categorical variables were described as numbers and percentage. Variables with a normal distribution were presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD), and the between-group comparisons were performed using Student's t test or ANOVA. Non-normal quantitative or ordinal variables were presented as the median and interquartile range (IQR, representing the values of the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles), and the between-group comparisons were performed using the Mann-Whitney or Kruskal-wallis tests.

Correlation was assessed using Spearman's rank ( $r_s$ , for analyses involving non-normal variables) or Pearson's ( $r_p$ , analysis including only variables with normal distribution) correlation tests. Confidence intervals for correlations were estimated using the Bootstrapping method with 1000 iterations. When we detected the possibility of outliers influencing the  $r_p$  on scatter plot, we performed Spearman correlation analysis as well as removed outliers and highly influential cases identified in simple linear regression. The possibility of non-linear associations was considered and tested displaying scatter plot graphics and comparing the curves that best fitted the data using the R-square statistic. Two-tailed P values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant.

Multiple linear regression models were built to evaluate the possibility of association of the 10-joint pD score with IL-6 independently from DAS28. Analysis of residuals and highly influential cases were performed as previously described (13). Partial regression coefficients and 95% confidence intervals (95% CIs) were estimated for the independent variables included in the model.

## Results

RA individuals (n=64) and 30 healthy controls were recruited from March, 2014 to May, 2015 (table 1). Among RA patients, white women predominated, and rheumatoid factor was present in about 63% of cases. Two third of patients were on oral steroids, and more than 80% were on methotrexate. Most patients (42.2%) had moderate disease activity according to DAS28, 23.4% high disease activity, 20.3% low disease activity, and 14.1% were in remission. Approximately 2040 images of 1020 joints were scanned in this study.

Interobserver agreement (kappa) for US features varied from 0.53 to 1.0. Intraclass correlation for 10-joint GS score was 0.964 (95% Confidence Interval, 0.899 to 0.986) and for 10-joint pD score was 0.859 (95% Confidence Interval, 0.646 to 0.941).

Cytokine levels were significantly higher in RA patients than controls, except for VEGF (Table 2). As expected, all tested cytokines correlated with each other, except



for VEGF (supplementary table 1). The correlations of cytokines with clinical and US parameters are shown in tables 3 and 4, respectively.

Among all tested cytokines, only IL-6 was consistently associated with DAS28 and US data on disease activity (Figures 1 and 2, respectively).

IL-6 was correlated with DAS28 ( $r_s$  0.31, 95%CI 0.07 to 0.52), ESR ( $r_s$  0.43, 95%CI 0.19 to 0.62), and swollen joint count ( $r_s$  0.39, 95%CI 0.15 to 0.59). IL-6 did not associate to tender joint count and HAQ.

Plasma IL-6 was associated with 10-joint pD score ( $r_s$  0.33, 95%CI 0.07 to 0.56), right and left wrists pD ( $r_s$  0.34, 95%CI 0.11 to 0.54, and  $r_s$  0.45, 95%CI 0.21 to 0.64, respectively), and right and left wrists GS ( $r_s$  0.40, 95%CI 0.20 to 0.59, and  $r_s$  0.35, 95%CI 0.08 to 0.57, respectively). As opposed to wrist GS, 10-joint GS score was not associated with IL-6 plasma concentration. Bone erosions were not associated with any of the tested cytokines ( $P \geq 0.17$  for all tests; data not shown). There was no evidence of non-linear associations between cytokines and any disease activity parameters.

Using multiple linear regression model, 10-joint pD score was positively associated with IL-6 levels independently of DAS28 ( $P=0.025$ ; see supplementary table 2). After removing 6 cases identified as outliers or highly influential ones, the independent association of 10-joint pD score was strengthened ( $P=0.009$ , supplementary table 3).

## Discussion

To the best of our knowledge, we report here, for the first time, the association of plasma IL-6 with pD synovitis on MSUS in patients with established RA taking traditional DMARDS. This association was found to be independent of DAS28. A previous study also showed increased plasma IL-6 levels associated with inflammatory ultrasound features, but in a different subset of RA – early treatment-naïve disease (14). Our sample was basically composed of persons with long standing active RA receiving non-biologic treatment. Therefore, the characteristics of the patients in our study differ importantly from the ones published by Baillet et al (14).

There are also a few studies on IL-6 and MSUS parameters performed in different settings. A recent study associated synovial tissue (synovectomy-obtained and

cultured synovial tissue of the hands joints) production of IL-6 with synovitis detected by MRI and color Doppler US (15) in RA. A genetic study testing polymorphisms for IL-6 (IL-6-174G/C, related to higher IL-6 production) and transforming growth factor  $\beta$  (869C/T) observed associations of these alleles with ultrasound-detected severity of bone erosions; no data on GS or pD or IL-6 plasma concentration were reported (16). Ball et al. found an association of plasma IL-6 with arthritis on physical examination and synovitis on MSUS in systemic lupus erythematosus patients with arthritis (17).

Almost all cytokines levels were higher in RA than in healthy controls. However, we could not detect a difference between the two groups in VEGF levels. Correspondingly, most cytokines correlated with each other, except for VEGF. Despite being higher in RA patients than in controls, all cytokines but IL-6 were not significantly associated with clinical and ultrasound variables. IL-4 associated with right wrist GS, but this probably represents a spurious finding. Since a very complex autoimmune process develops within the RA joint, our results on the association of IL-6 and MSUS pD may be in part explained by the fact that local inflamed synovial environment is a prominent source of IL-6. IL-6 stimulates angiogenesis (18), and this reassures its association with higher pD scores, the trait of inflammation on MSUS.

IL-6 is a proinflammatory cytokine with a wide range of pleiotropic activities. In active disease, the main production of IL-6 comes from activated macrophages and fibroblast-like synoviocytes in the joint (18). It is capable of mediating cartilage and bone damage, including induction of acute phase proteins and stimulation of T and B cells, synoviocytes and osteoclasts, with essential roles both in innate and adaptive immune responses (19,20). IL-6, along with TNF, are considered to be central cytokines in RA pathogenesis. There is unequivocal clinical benefit on the inhibition of TNF and IL-6 in RA treatment, and this fact supports their importance above the entire cytokine network in this disease (20). As a matter of fact, both TNF and IL-6 are currently considered as potential biomarkers in RA (21).

We also found that IL-6 was associated with swollen, but not with tender joint count. As previously demonstrated, swollen joint count is associated with pD, GS and bone erosion on MSUS; this was not observed with tender joints (22). It has been shown that, in longstanding disease, joint count may be biased by deformities (23,24), and concordance between patient's evaluation of joint involvement and US assessment is poor (with agreement rates of around 50%) (25). Also, structural progression of RA has been closely associated with swollen joint count but not with pain (26,27); overall,

available data corroborates our findings of high levels of IL-6 associating with objectively joint swelling and not with tenderness, a subjective parameter on physical examination.

Currently, no agreement exists regarding which joints and tendons should be systematically assessed by ultrasonography (US) to assess inflammation in RA. A systematic review on the subject did not reach a consensus (28). Recent studies have focused on the preferred musculoskeletal sites to be examined (29–31). Interestingly, a novel score composed of a bilateral approach of 6 hand joints (first, second and third MCP joints, second and third PIP joints and radiocarpal joint), 2 feet joints (second and third metatarsophalangeal joints) and 1 tendon (extensor carpi ulnaris) performed better than previous reported scores in a longitudinal analysis (31). In our study, we used a score composed exclusively by hand joints, and both hands were examined. We did not include any feet joint or tendon in the MSUS evaluation, which may represent a limitation of our work.

MSUS studies have demonstrated up to moderate correlations of ultrasound scores with clinical composite scores of disease activity so far (28–33). The lack of excellent correlation coefficients could be related to the great difficulty in translating true global inflammatory activity in a score, either clinical or in ultrasonography. Rheumatologists have been using DAS28 and other scores as the gold standard for assessment of disease activity in RA for many years (34), and these tools have clearly brought great progress in treatment monitoring. We must be aware that, even though they are the best validated methods of measuring disease activity to date, the perfect way of objectively defining inflammation on the patient's level still does not exist. This is supported by the fact that image techniques such as MSUS are more sensitive than physical examination for the detection of arthritis (35–38), and that MSUS may possibly be more reliable than DAS28 to assess disease activity (39). The best way of combining clinical, image and laboratory data remains to be defined.

### Conclusion

Our study demonstrated an association of IL-6 levels with inflammatory findings on MSUS independently of DAS28 in patients with established rheumatoid arthritis.

## References

1. Firestein G. Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. In: GS Firestein. RC Budd. SE Gabriel. IB McInnes. JR O'Dell, eds. *Kelley's textbook of rheumatology*. Philadelphia: Saunders. 2013:1059–108.
2. McInnes I, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429–42.
3. Scott D, Wolfe F, Huizinga T. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094–108.
4. O'Dell J. Treatment of Rheumatoid Arthritis. In: GS Firestein. RC Budd. SE Gabriel. IB McInnes. JR O'Dell, eds. *Kelley's textbook of rheumatology*. Philadelphia: Saunders. 2013: 1137–60.
5. Bisi M, do Prado A, Rabelo C, Brollo F, da Silveira I, JA M, et al. Articular ultrasonography: interobserver reliability in rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reum* 2014;54:250–4.
6. Colebatch A, Edwards C, Østergaard M, van der Heijde D, Balint P, D'Agostino M, et al. EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:804–14.
7. Nguyen H, Ruysen-Witrand A, Gandjbakhch F, Constantin A, Foltz V, Cantagrel A. Prevalence of ultrasound-detected residual synovitis and risk of relapse and structural progression in rheumatoid arthritis patients in clinical remission: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology* 2014;53:2110–8.
8. Iwamoto T, Ikeda K, Hosokawa J, Yamagata M, Tanaka S, Norimoto A, Sanayama Y, Nakagomi D, et al. Prediction of relapse after discontinuation of biologic agents by ultrasonographic assessment in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission: high predictive values of total gray-scale and power Doppler scores that represent residual synovial. *Arthritis Care Res* 2014;66:1576–81.
9. Fransen J, van Riel P. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:93–9.
10. Bruce B, Fries J. The Health Assessment Questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:14–8.
11. Naredo E, Bonilla G, Gamero F, Uson J, Carmona L, Laffon A. Assessment of inflammatory activity in rheumatoid arthritis: a comparative study of clinical evaluation with grey scale and power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis* 2005;64:375–81.
12. Wakefield R, Balint P, Szkudlarek M, Fillipucci E, Backhaus M, D'Agostino M. OMERACT 7 Special Interest Group. Musculoskeletal ultrasound including definitions for ultrasonographic pathology. *J Rheumatol* 2005;32:2485–7.
13. Ranzolin A, Brenol J, Bredemeier M, Guarienti J, Rizzatti M, Feldman D, et al. Association of concomitant fibromyalgia with worse disease activity score in 28 joints, health assessment questionnaire, and short form 36 scores in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;61:794–800.
14. Baillet A, Gossec L, Paternotte S, Etcheto A, Combe B, Meyer O, et al. Evaluation of Serum Interleukin-6 Level as a Surrogate Marker of Synovial Inflammation and as a Factor of Structural Progression in Early Rheumatoid Arthritis: Results From a French National Multicenter Cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2015;67:905–12.

15. Andersen M, Boesen M, Ellegaard K, Christensen R, Söderström K, Sjøe N, et al. Synovial explant inflammatory mediator production corresponds to rheumatoid arthritis imaging hallmarks: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R107.
16. Ceccarelli F, Perricone C, Fabris M, Alessandri C, Iagnocco A, Fabro C, et al. Transforming growth factor b 869C/T and interleukin 6 -174G/C polymorphisms relate to the severity and progression of bone-erosive damage detected by ultrasound in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R111.
17. Ball E, Gibson D, Rooney AB. Plasma IL-6 levels correlate with clinical and ultrasound measures of arthritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014;23:46–56.
18. Brzustewicz E, Bryl E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis – Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine* 2015;76:527–36.
19. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine: 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1–21.
20. McInnes I, Buckley C, Isaacs J. Cytokines in rheumatoid arthritis — shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:63–8.
21. Niu X, Chen G. Clinical biomarkers and pathogenic-related cytokines in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res* 2014;2014:698192.Epub 2014 Aug 21.
22. Do Prado A, Bisi M, Piovesan D, Bredemeier M, Silveira I, Mendonça J, et al. Association of clinical examination with gray scale and power Doppler ultrasonography in established rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2016;In press.
23. Le Boedec M, Jousse-Joulin S, Ferlet JF, Marhadour T, Chales G GL. Factors influencing concordance between clinical and ultrasound findings in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2013;40:244–52.
24. Joulin S, D’Agostino M, Marhadour T, Albert J, Bentin J, Valckenaere I, et al. Reproducibility of joint swelling assessment by sonography in patients with long-lasting rheumatoid arthritis (SEA-Repro study part II). *J Rheumatol* 2010;37:938–45.
25. Yoshimi R, Toyota Y, Tsuchida N, Sugiyama Y, Kunishita Y, Kishimoto D, et al. Considerable Discrepancy Between Patient’s Assessment and Ultrasonography Assessment on the Most Affected Joint in Rheumatoid Arthritis [abstract]. *Arthritis Rheumatol* 2015;67 (Suppl 10).
26. Filer A, de Pablo P, Allen G, Nightingale P, Jordan A, Jobanputra P. Utility of ultrasound joint counts in the prediction of rheumatoid arthritis in patients with very early synovitis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70(3):500-7. *Ann Rheum Dis* 2011;70:500–7.
27. Smolen J, Van Der Heijde D, St Clair E, Emery P, Bathon J, Keystone E, et al. Predictors of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with high-dose methotrexate with or without concomitant infl iximab: results from the ASPIRE trial. *Arthritis Rheum* 2006;54:702–10.
28. Mandl P, Naredo E, Wakefield R, Conaghan P, D’Agostino M, OMERACT Ultrasound Task Force., et al. A systematic literature review analysis of ultrasound joint count and scoring systems to assess synovitis in rheumatoid arthritis according to the OMERACT filter. *J Rheumatol* 2011;38:2055–62.
29. Yoshimi R, Ihata A, Kunishita Y, Kishimoto D, Kamiyama R, Minegishi K, et al. A novel 8-joint ultrasound score is useful in daily practice for rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2015;25:379–85.

30. Zufferey P, Brulhart L, Tamborrini G, Finckh A, Scherer A, Moller B, et al. Ultrasound evaluation of synovitis in RA: correlation with clinical disease activity and sensitivity to change in an observational cohort study. *J Bone Spine* 2014;81:222–7.
31. Aga A, Lie E, Olsen I, Hammer H, Uhlig T, van der Heijde D, et al. Development of an Ultrasound Joint Inflammation Score for Rheumatoid Arthritis through a Data-Driven Approach [abstract]. *Arthritis Rheumatol* 2015;67(Suppl 10).
32. Backhaus M, Ohrndorf S, Kellner H, Strunk J, Backhaus T, Hartung W. Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practise: a pilot project. *Arthritis Rheum* 2009;61:1194–201.
33. Backhaus T, Ohrndorf S, Kellner H, Strunk J, Hartung W, Sattler H, et al. The US7 score is sensitive to change in a large cohort of patients with rheumatoid arthritis over 12 months of therapy. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1163–9.
34. Van der Heijde D, van 't Hof M, van Riel P, Theunisse L, Lubberts E, van Leeuwen 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* 1990;49:916–20.
35. Szkudlarek M, Narvestad E, Klarlund M, Court-Payen M, Thomsen HS, Østergaard M. Ultrasonography of the metatarsophalangeal joints in rheumatoid arthritis: comparison with magnetic resonance imaging, conventional radiography, and clinical examination. *Arthritis Rheum* 2004;50:2103–12.
36. Wakefield RJ, Green M, Marzo-Ortega H, Conaghan PG, Gibbon W, McGonagle DG. Should oligoarthritis be reclassified? Ultrasound reveals a high prevalence of subclinical disease. *Ann Rheum Dis* 2004;63:382–5.
37. Naredo E, Bonilla G, Gamero F, Uson J, Carmona L, Laffon A. Assessment of inflammatory activity in rheumatoid arthritis: a comparative study of clinical evaluation with grey scale and power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis* 2005;64:375–81.
38. Ogishima H, Tsuboi H, Umeda N, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M. Analysis of subclinical synovitis detected by ultrasonography and low-field magnetic resonance imaging in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2014;24:60–8.
39. Damjanov N, Radunovic G, Prodanovic S, Vukovic V, Milic V, Simic Pasalic K. Construct validity and reliability of ultrasound disease activity score in assessing joint inflammation in RA: comparison with DAS-28. *Rheumatol.* 2012;51:120–8.

**Anexo E– Critérios para Classificação de Artrite Reumatoide Segundo o Colégio Americano de Reumatologia - 1987 - (ACR 1987)**

Classifica-se como artrite reumatoide o paciente que apresentar pelo menos 4 dos itens listados abaixo. Itens 1, 2, 3, 4 devem ter duração de no mínimo 6 semanas.

1. rigidez matinal (nas articulações, com pelo menos 1 hora de duração);
2. artrite de três ou mais das seguintes áreas: interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos e metatarsofalangeanas;
3. artrite de mãos (punhos, metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais);
4. artrite simétrica (mesma área em ambos os lados do corpo);
5. nódulo reumatoide (presença de 1 ou mais nódulos subcutâneos sobre proeminências ósseas ou superfícies extensoras ou regiões periarticulares);
6. fator reumatoide positivo;
7. alterações radiográficas (erosões ou rarefação óssea periarticular em radiografias de mãos e punhos).

**Anexo F– Critérios para Classificação de Artrite Reumatoide do Colégio Americano de Reumatologia/Liga Europeia Contra o Reumatismo(Critérios ACR/EULAR 2010)**

Critérios aplicáveis a qualquer paciente que apresente artrite em pelo menos 1 articulação, que não seja justificada por outra causa. Pontuação igual ou maior que 6/10 indica AR definida:

**A. envolvimento articular**, excluídas interfalangeanas distais de mãos e pés, primeiras metatarsofalangeanas e primeiras carpometacárpicas (pontuação de 0-5)

1 articulação grande (ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos): 0

2 a 10 articulações grandes (ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos): 1

1 a 3 articulações pequenas (MCFs, 1a IFTs, IFTs proximais, 2a a 5a MTFs e punhos): 2

4 a 10 articulações pequenas (MCFs, 1ª TFs, TFs proximais, 2ª a 5ª MTFs e punhos): 3

mais de 10 articulações (pelo menos 1 pequena articulação e grandes articulações temporomandibulares, esternoclaviculares e acromioclaviculares): 5

**B. sorologia** (pontuação de 0-3)

fator reumatoide e anticorpo anticitrulina negativos: 0

fator reumatoide ou anticorpo anticitrulina positivos em baixos títulos (até 3 vezes o limite superior da normalidade): 2

fator reumatoide ou anticorpo anticitrulina positivos em altos títulos (3 vezes acima do limite superior da normalidade): 3

**C. duração dos sintomas** (pontuação de 0-1)

menos de 6 semanas: 0

igual ou superior a 6 semanas: 1

**D. reagentes de fase aguda** (pontuação de 0-1)

proteína C reativa e velocidade de sedimentação globular normais: 0

proteína C reativa ou velocidade de sedimentação globular alteradas: 1



## Anexo G – Escore de Atividade de Doença com Vinte e Oito Articulações

O DAS 28 é calculado a partir das seguintes variáveis:

- número de articulações dolorosas entre 28 articulações (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, ombros e joelhos)
- número de articulações edemaciadas entre 28 articulações (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, ombros e joelhos)
- velocidade de sedimentação globular (VSG em mm/h)
- Escala Visual Analógica de Saúde Global segundo o paciente (EVA: 0 a 100 mm).

Categorização do DAS28: remissão < 2,6; atividade baixa < 3,2; atividade moderada < 5,1; atividade alta > 5,1.

Fórmula para cálculo do DAS28:

$$0.56 * \text{raiz quadrada}(\text{dolorosas}28) + 0.28 * \text{raiz quadrada}(\text{edemaciadas}28) + 0.70 * \log(\text{VSG}) + 0.014 * \text{EVA}$$

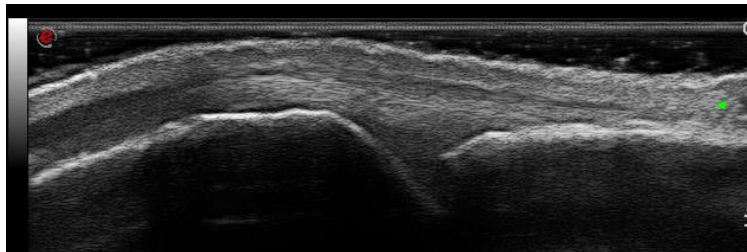
## Anexo H – Health Assessment Questionnaire - HAQ

		Sem dificuldade	Com alguma dificuldade	Com muita dificuldade	Incapaz de fazer
1	Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos seus sapatos, abotoar as suas roupas?	0	1	2	3
2	Lavar sua cabeça e os seus cabelos?	0	1	2	3
3	Levantar-se de uma maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços?	0	1	2	3
4	Deitar-se e levantar-se da cama?	0	1	2	3
5	Cortar um pedaço de carne?	0	1	2	3
6	Levar à boca um copo ou uma xícara cheia de café, leite ou água?	0	1	2	3
7	Abrir um saco de leite comum?	0	1	2	3
8	Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9	Subir cinco degraus?	0	1	2	3
10	Lavar seu corpo inteiro e secá-lo após o banho?	0	1	2	3
11	Tomar um banho de chuveiro?	0	1	2	3
12	Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13	Levantar os braços e pegar um objeto de mais ou menos 2,5 quilos, que está posicionado um pouco acima de sua cabeça?	0	1	2	3
14	Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15	Segurar-se em pé no ônibus ou no metrô?	0	1	2	3
16	Abrir potes ou vidros de conserva que tenham sido previamente abertos?	0	1	2	3
17	Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18	Fazer compras na redondeza onde mora?	0	1	2	3
19	Entrar e sair de um ônibus?	0	1	2	3
20	Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e o rodo para puxar água?	0	1	2	3

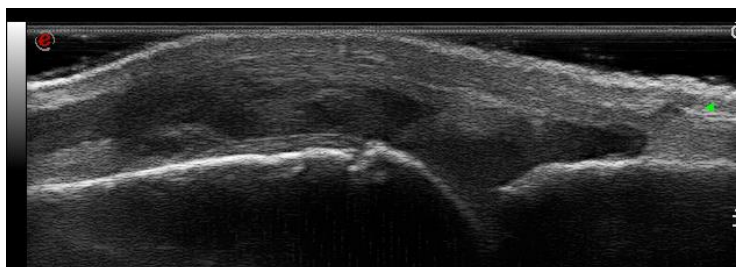
**APÊNDICES**

## APÊNDICE A –Exemplos de imagens ultrassonográficas obtidas

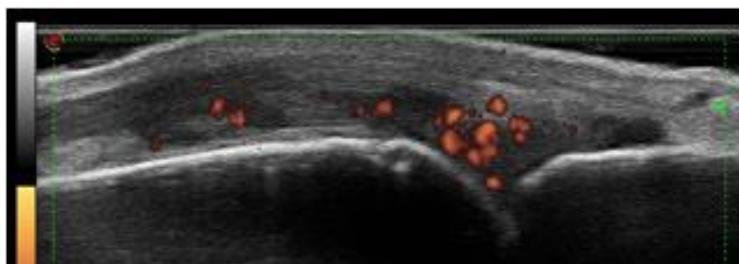
Transdutor posicionado sobre a 3ª articulação metacarpofalangeana, em região dorsal, de maneira longitudinal. Articulação normal.



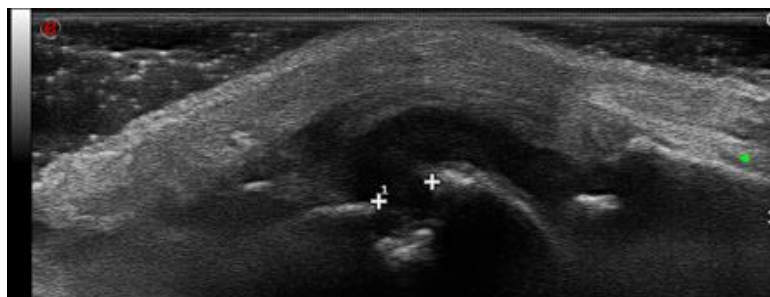
Transdutor posicionado sobre a 2ª articulação metacarpofalangeana, em região dorsal, de maneira longitudinal. Presença de imagem hipocóica, distendendo a cápsula articular e comprimindo o tendão extensor, compatível com proliferação sinovial de grau 3.



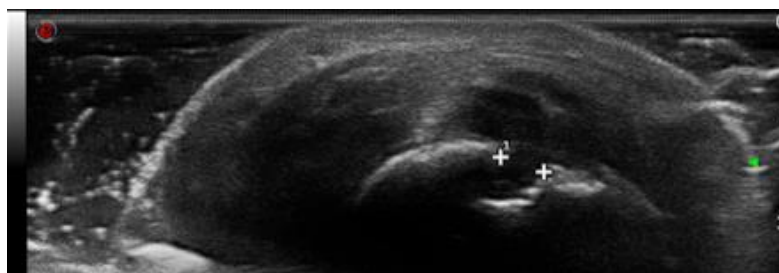
Transdutor posicionado sobre a 2ª articulação metacarpofalangeana, em região dorsal, de maneira longitudinal. Presença captação de sinal de power Doppler comprometendo menos de 50% da área de proliferação sinovial, compatível com captação de power Doppler de grau 2.



Transdutor posicionado sobre a 2ª articulação metacarpofalangeana, em face radial, de maneira longitudinal e transversal. Presença de interrupção da cortical óssea vista em ambos os planos, configurando erosão óssea.



longitudinal



transversal

## APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título** - Achados inflamatórios e dano estrutural vistos por ultrassonografia em pacientes com artrite reumatoide: correlação com dados clínicos, citocinas inflamatórias e linfócitos T regulatórios e Th-17 no sangue periférico

#### POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

O ambulatório de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS atende centenas de pacientes portadores de diversas doenças reumáticas, entre elas, a artrite reumatoide.

Este estudo está sendo realizado para avaliar as alterações existentes nos exames de sangue que indicam inflamação nos pacientes portadores de artrite reumatoide. Também, queremos pesquisar se existe alguma ligação entre os resultados de exames de sangue e alterações vistas no exame de ultrassonografia das articulações das mãos e punhos e o senhor (a) está sendo convidado (a) a participar deste estudo. A participação neste estudo é voluntária, e não afeta seu atendimento regular no ambulatório de reumatologia. Isso significa que, se o senhor (a) decidir não participar, suas consultas e exames no ambulatório de reumatologia seguem normalmente.

Se o senhor (a) concordar em participar do estudo, será necessária a sua colaboração para alguns procedimentos. Basicamente, faremos uma coleta de sangue, examinaremos suas articulações e realizaremos o exame de ultrassonografia, que pode ser demorado. Detalhes serão descritos a seguir:

#### DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Os prontuários (documento onde todas as consultas são registradas) serão revisados, com o cuidado de manter o nome do paciente e as informações sobre sua doença em sigilo.

Após sua consulta regular no ambulatório de reumatologia de nosso hospital, os seguintes procedimentos serão feitos:

1. Um reumatologista irá fazer a contagem das articulações edemaciadas e dolorosas e aplicar um questionário sobre avaliação de qualidade de vida.
2. Outro reumatologista irá realizar um exame ecográfico das articulações das mãos e dos punhos. Este exame não dói e dura cerca de 40 minutos.

3. Uma amostra de sangue para dosagem de substâncias que podem estar alteradas nos pacientes com artrite reumatoide será coletada. As seguintes substâncias serão dosadas: IL2, IL4, IL6, IL 10, IL17, TNF, IFN  $\gamma$ , VEGF, linfócitos T-regulatórios, linfócitos Th-17, VHS, PCR, FR, hemograma. Durante a coleta de sangue, é comum sentir dor no local da picada e pode haver a formação de hematomas e sangramentos. Essa amostra de sangue será usada para a realização dos exames de sangue deste estudo, mas também uma parte dela será armazenada para estudos futuros. Durante todo esse estudo e também para o armazenamento da amostra de sangue, os nomes dos participantes da pesquisa serão mantidos em sigilo. As amostras de sangue armazenadas serão identificadas através de números, dessa maneira, seu nome não ficará visível, não sendo possível relacionar a amostra de sangue e as substâncias dosadas com o seu nome.

#### QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTA ESTUDO?

1. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a artrite reumatoide.
2. Existência de mínimo risco para o paciente (coleta de sangue e exame de ultrassonografia)
3. Todos os procedimentos do estudo serão feitos após a consulta rotineira no ambulatório de Reumatologia, o que não implica em comparecimento adicional ao hospital para participar da pesquisa.

#### QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DESTA ESTUDO?

1. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma).
2. A ecografia articular é um exame demorado, a pessoa precisa ficar vários minutos na mesma posição para que o exame seja feito corretamente.
3. O paciente que desejar participar da pesquisa precisará ficar no hospital cerca de 2 horas a mais além do tempo que ficaria apenas para a consulta de rotina.

#### DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento e tratamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital São Lucas da PUCRS.
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

## COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, autorizo a revisão do prontuário, realização de contagem articular, aplicação de questionário de qualidade de vida, realização de ecografia articular, realização de raio-X de mãos e coleta de sangue. Aceito participar do projeto PROJETO CITUS-Treg: Dano Estrutural Articular por Ultrassonografia em Artrite Reumatoide e sua correlação com citocinas inflamatórias e linfócitos T regulatórios no sangue periférico. Autorizo, também, o armazenamento de uma amostra de sangue coletado para estudos futuros.

Nome: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

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

Nome da pessoa que conduziu o processo de obtenção de consentimento:

\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

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

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Aline Defaveri do Prado

Tel: (51)3320 5057 (51) 3320 3000 – ramal 2368 (51) 81247758

Dr. Henrique Luiz Staub

Tel: (051)33205057 (51) 33203000 – ramal 2368 (51) 33288111

Comitê de Ética e Pesquisa: Tel: (51) 33203345



**APÊNDICE C–Protocolo de coleta de dados clínicos**

CITUSTreg #

Data:

Nome:

Idade:

Data Nascimento:

Prontuário:

Sexo ( ) masculino ( ) feminino

Raça ( ) branca ( ) negra ( ) parda

Profissão:

Estado civil:

Procedência:

Telefone:

**COMORBIDADES**

<input type="checkbox"/> HAS	<input type="checkbox"/> DM	<input type="checkbox"/> Sjogren	<input type="checkbox"/> Dislipidemia
<input type="checkbox"/> CI	<input type="checkbox"/> Obesidade	<input type="checkbox"/> Osteoporose	<input type="checkbox"/> Artrose
<input type="checkbox"/> Hipotireoidismo	<input type="checkbox"/> Tabagismo	<input type="checkbox"/> Fibromialgia	<input type="checkbox"/>

**ARTRITE REUMATOIDE**

Data diagnóstico:		Início dos sintomas:	
<input type="checkbox"/> Rigidez matinal >1h	<input type="checkbox"/> Artrite mãos	<input type="checkbox"/> Artrite em 3 ou mais articulações	<input type="checkbox"/> Artrite simétrica
<input type="checkbox"/> Nódulos reumatoides	<input type="checkbox"/> FR positivo	<input type="checkbox"/> Erosões em radiografia	

## MEDICAMENTOS EM USO:

Medicação	Dose
Prednisona	
Metotrexate	
Leflunomida	
Cloroquina	
Sulfassalazina	

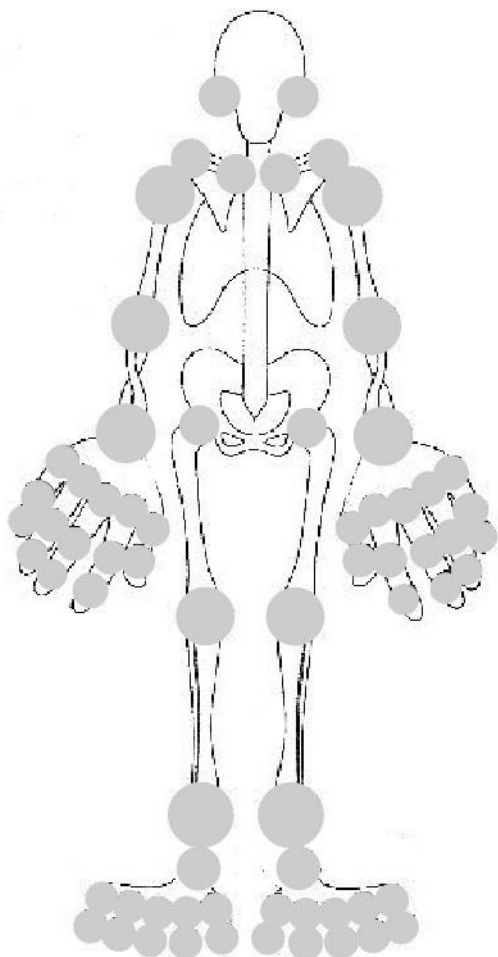
## EXAMES LABORATORIAIS:

FR	
Anti-CCP	
VSG	
PCR	
Linfócitos totais	

## ESCALA ANALÓGICA VISUAL DO PACIENTE



## Exame físico articular



## LEGENDA EXAME FÍSICO ARTICULAR:

○ = edema

⊗ = edema e dor

⊕ = dor

DAS 28	
HAQ	
Classe Funcional	
Rigidez matinal (h)	
No articulações dolorosas	
No articulações edemaciadas	