

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

CRISTINA FERREIRA RABELO

**PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM ESPONDILITE
ANQUILOSANTE**

Porto Alegre,
2016

CRISTINA FERREIRA RABELO

**PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM ESPONDILITE
ANQUILOSANTE**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Henrique Luiz Staub

Porto Alegre,
2016

Ficha Catalográfica

R114p Rabelo, Cristina Ferreira

Perfil de Citocinas em Pacientes com Espondilite Anquilosante /
Cristina Ferreira Rabelo . – 2016.

88 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub.

1. Espondilite Anquilosante. 2. Citocinas. 3. Índices de Atividade de
Doença. 4. Escore de Qualidade de Vida. I. Staub, Henrique Luiz. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Henrique L. Staub, meu orientador, pelo apoio sempre presente, ensinamentos valiosos e orientação competente.

À equipe do Laboratório de Imunologia do Envelhecimento/Instituto de Pesquisas Biomédicas (PUCRS), especialmente a Talita Baptista, Laura Petersen e Júlia, pela amizade, incentivo, competência técnica e imensa disponibilidade para ajudar. Aprendi muito com a convivência no laboratório, sem o qual esta pesquisa não teria sido possível.

Aos pacientes do ambulatório de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS e voluntários que compareceram ao banco de sangue para doação, que atenciosamente, aceitaram participar desta pesquisa.

Ao serviço de Reumatologia da PUCRS e seus residentes, preceptores e professores, que durante este projeto me apoiaram muito, ajudando com idéias, assistência aos meus pacientes internados e imensa compreensão com a minha ausência do serviço durante este projeto. Obrigada também às senhoras Lourdes Dias e Heidi Medina pela colaboração e carinho.

Ao Dr. Marco Aurélio Goldenfum, que como presidente da Sociedade Gaúcha de Reumatologia, apoiou este projeto através do fundo para apoio à pesquisa da entidade.

À querida Jéssica Willes, que dividiu comigo as angústias, as incertezas, o trabalho acumulado, a dificuldade de fazer ciência e manter-se firme no atendimento de pacientes graves. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo exemplo de garra e competência no trabalho e por compartilhar comigo a sua alegria pela vida.

À família, que sempre está próxima no meu coração.

“A verdade biológica é transitória”
Iran Rabelo

RESUMO

Introdução. A espondilite anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica que acomete predominantemente o esqueleto axial (coluna vertebral e articulações sacrílicas); observa-se também artrite periférica e manifestações sistêmicas. Citocinas pró-inflamatórias provavelmente estão envolvidas na patogênese da EA. A correlação entre as concentrações séricas de citocinas com instrumentos de avaliação clínica na EA é tema em aberto. Nesta pesquisa comparamos níveis séricos de citocinas em pacientes com EA e controles saudáveis e correlacionamos com índices de atividade de doença e qualidade de vida.

Métodos. Estudo transversal, controlado, incluiu 32 pacientes pareados por idade e sexo com 32 controles saudáveis. Os instrumentos de avaliação clínica BASDAI, ASDAS-PCR, BASFI, BASMI, MASES, ASQoL e AGP foram aplicados nos pacientes com EA. As citocinas solúveis IL-6, IL-8, IL1 β , IL-10, TNF- α , IL-12p70 e IL-17 foram quantificadas por citometria de fluxo. As concentrações de IL-23 foram obtidas por ELISA.

Resultados. Os paciente com EA eram predominantemente homens (59.4%) e caucasianos (96.9%). A idade média foi de 46.9 (\pm 10.7 anos). O HLA-B27 estava presente em 70% dos casos. Concentrações de IL-6, IL-8, TNF- α e IL-10 estavam mais elevadas nos pacientes com EA em relação aos controles. As concentrações médias de IL-6 se correlacionaram com o BASMI, um índice que avalia a mobilidade axial ($r_s=0.354$, $p=0.047$). O uso de medicações anti-TNF (presente em 21 pacientes, 65.6%) foi associado a um BASMI elevado ($p=0.042$), significando pior mobilidade axial, e baixa qualidade de vida avaliada pelo ASQoL ($p=0.009$).

Conclusões. Um perfil de citocinas pró-inflamatórias predominou nos pacientes com EA; de forma intrigante a IL-10, uma citocina anti-inflamatória, também estava elevada, indicando uma tendência a um controle supressivo da inflamação. A correlação significativa da IL-6 com o BASMI sugere a participação desta citocina na lesão axial. Usuários de anti-TNF tiveram mais lesão axial e pior qualidade de vida.

Palavras chave: espondilite anquilosante; citocinas; índices de atividade de doença; escore de qualidade de vida.

ABSTRACT

Introduction. Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic disease featuring axial changes, peripheral arthritis and systemic involvement. Proinflammatory cytokines are probably involved in AS pathogenesis. The relationship of circulating cytokines with instruments of AS evaluation is an open field. We herein compared serum levels of cytokines in AS patients and healthy controls, and searched for correlations of cytokines with indexes of disease activity and quality of life.

Methods. In this cross-sectional study, 32 AS patients and 32 age-and-sex matched controls were evaluated. BASDAI, BASFI, BASMI, ASDAS-CRP, MASES, ASQol and PGA were measured in AS patients. The soluble cytokines IL-6, IL-8, IL-1, IL-10, TNF- α , IL-12p70 and IL-17 were quantified by flow cytometry. IL-23 concentrations were obtained in an ELISA.

Results. Overall, AS patients were predominantly males (59.4%) and Caucasians (96.9%). Mean age was 46.9 \pm 10.7 years. HLA B27 was present in 70% of cases. Concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α were higher in AS cases than controls. Mean concentration of IL-6 correlated with the BASMI, an index of axial mobility ($r_s = 0.354$, $p = 0.047$). Anti-TNF intake (present in 21 patients, 65.6%) associated with a high BASMI ($p = 0.042$) and lower quality of life as measured by the ASQol ($p = 0.009$).

Conclusions. A proinflammatory cytokine profile predominated in AS patients, but interestingly the IL-10 concentrations were also elevated, pointing to an attempt of a suppressive control of inflammation. A defined correlation of serum IL-6 with the BASMI suggests a role for this cytokine in axial disease. Anti-TNF users had more axial activity and lower quality of life.

Key words: ankylosing spondylitis; cytokines; disease activity index; quality of life score.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Conceitos gerais da fisiopatologia das espondiloartrites.....	15
Figura 2: Estrutura do HLA classe 1.	17
Figura 3: Processamento intracelular de proteínas e apresentação de antígenos para o LTCD8+ através do MHC de classe I.....	18
Figura 4: Fisiopatologia da espondilite anquilosante: Relações entre polimorfismos genéticos, presença do HLA-B27, interação com células do sistema imunológico e produção de citocinas.	20
Figura 5: Produção de citocinas na espondilite anquilosante.	23
Figura 6: Critérios Classificatórios da EA.....	26
Figura 7: Critérios classificatórios das EpA axiais.....	27
Figura 8: Distribuição gráfica da comparação das concentrações de IL-6, TNF- α e IL-8 entre pacientes e controles.....	39
Figura 9: Distribuição gráfica da comparação das concentrações de IL-10 entre pacientes e controles.	40
Figura 10: Correlação das concentrações de IL-6 com o BASMI ($r_s=0.354$, $p=0.047$, Spearman test).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas da espondilite anquilosante.....	25
Tabela 2: Características demográficas e clínicas dos pacientes com EA.	38
Tabela 3: Comparação da concentração de citocinas (pg/mL) entre pacientes e controles.	39
Tabela 4: Correlações entre citocinas e variáveis clínicas através do coeficiente de Spearman	40
Tabela 5: Associações entre usuários e não usuários de anti-TNF e concentrações séricas de citocinas em pacientes com espondilite anquilosante.....	41
Tabela 6: Associação entre uso de anti-TNF e variáveis clínicas	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag - Antígeno
AGP - Avaliação global do paciente
AINH - Anti-inflamatório não hormonal
AP - Aminopeptidases
ASAS - Assessment of SpondyloArthritis international Society
ASDAS - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
ASQoL - Ankylosing Spondylitis Quality of Life
BASDAI - Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI - Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BASMI - Bath Ankylosing Spondylitis Metrologic Index
CE - Corticoesteróides
DII - Doenças inflamatórias intestinais
DMCD - Drogas modificadoras do curso de doença
DNA - Ácido desoxirribonucléico
EA - Espondilite anquilosante
EpA - Espondiloartrites
ERAP1 - *Encoding endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*
ERAP2 - *Encoding endoplasmic reticulum aminopeptidase 2*
EUA - Estados Unidos da América
EULAR - European League Against Rheumatism
HLA - *Human leukocyte antigen*
HLA-B27 - *Human leukocyte antigen B27*
HSL - Hospital São Lucas
IL - Interleucina
IL-1 β - IL-1beta
IL-23R - Receptor da IL-23
LPI - Lombalgia de padrão inflamatório
LT - Linfócitos T
LT CD4+ - Linfócitos T auxiliares
LT CD8+ - Linfócitos T citotóxicos
MASSES - Maastricht Akylosing Spondylitis Enthesitis Score
MHC tipo1 - Complexo principal de histocompatibilidade tipo 1

NADP - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NK - *Natural killer*

PA - Peptídeo artritogênico

PCR - Proteína C reativa

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RER - Retículo endoplasmático rugoso

RNM - Ressonância nuclear magnética

SI - Sacroiliíte

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TNFR1 - Receptor 1 do fator de necrose tumoral

TNFR2 - Receptor 2 do fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UPR - *Unfolded protein response*

VHS - Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	ESPONDILITE ANQUILOSANTE	14
1.2	EPIDEMIOLOGIA	14
1.3	PATOGENESE E FISIOPATOLOGIA	15
1.3.1	Conceitos Gerais	15
1.3.2	Genética	16
1.3.2.1	Complexo principal de histocompatibilidade tipo 1 (MHC tipo1): Conceitos e funções	16
1.3.2.2	Hipóteses do papel do HLA-B27 na EA	19
1.3.3	Citocinas e Espondilite Anquilosante	21
1.3.4	Inflamação e lesão tecidual na espondilite anquilosante	23
1.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	24
1.5	CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS	25
1.6	INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO CLÍNICA	28
1.7	TRATAMENTO	29
1.7.8	Tratamento não Farmacológico	29
1.7.9	Tratamento Farmacológico	29
2	JUSTIFICATIVAS	31
3	HIPÓTESES	32
3.1	HIPÓTESE CONCEITUAL	32
3.2	HIPÓTESE OPERACIONAL	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVOS GERAIS	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5	MATERIAIS E METODOS	34
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	34
5.2	POPULAÇÃO EM ESTUDO	34
5.2.1	Casos	34
5.2.2	Controles	34

5.2.3	Metodologia	35
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
6	RESULTADOS	37
7	DISCUSSÃO.....	43
8	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A – BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) validado para o português	59
	ANEXO B – ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score) ...	60
	ANEXO C – BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index) validado para o português	61
	ANEXO D – ASQoL (Ankylosing Spondylitis Quality of Life) validado para o português.....	62
	ANEXO E – BASMI 10 (Bath Ankylosing Spondylitis Metrologic Index)	63
	ANEXO F – MASES (Maastricht Akylosing Spondylitis Enthesitis Score)	67
	ANEXO G – Termo de Aprovação do Comitê Científico	68
	ANEXO H – Termo de Aprovação do Comitê de Ética e Registro Plataforma Brasil.....	70
	ANEXO I – Comprovante de Submissão de Artigo	72
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento - Pacientes	73
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento – Grupo Controle.....	74
	APÊNDICE C – Formulário de avaliação clínica	75
	APÊNDICE D –Artigo Submetido	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESPONDILITE ANQUILOSANTE

A espondilite anquilosante (EA) é classificada como uma das espondiloartrites (EpA). Este é um grupo de doenças inflamatórias sistêmicas crônicas que compartilham características fenotípicas, manifestações clínicas e marcadores genéticos (1). Podem comprometer predominantemente o esqueleto axial (coluna vertebral e articulações sacrílicas) ou as articulações periféricas, sendo classificadas de forma diferente, como EpA axiais ou periféricas respectivamente (2).

Pertencem também a esta família a artrite psoriásica, artrite relacionada às doenças inflamatórias intestinais (DII) (doença de Crohn e retocolite ulcerativa), a artrite reativa e a espondiloartrite indiferenciada (2).

A EA foi a primeira doença descrita, é a mais grave, por ser muito debilitante, e se destaca por ser a mais prevalente do grupo. A sua característica mais marcante e definidora, é o envolvimento da coluna vertebral, sendo portanto uma EpA axial (3).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A prevalência mundial da EA é variável e geralmente acompanha a prevalência do *human leukocyte antigen* B27 (HLA-B27) na população estudada. Esta molécula é um alelo do complexo principal de histocompatibilidade tipo 1 (MHC tipo1) (4). Estima-se que cerca de 90% dos pacientes com EA possuem o alelo HLA-B27 (5).

A doença é mais prevalente nos Estados Unidos da América (EUA) (31.9/10.000) e na Europa (23.8/10.000). Estima-se entre 1.30 a 1.56 milhões de casos somente neste último continente (6).

A população caucasiana é mais acometida e é muito rara em negros (7). É mais frequente em homens do que mulheres, na razão de 2:1. Os jovens são mais afetados com início dos sintomas antes dos 30 anos em 80% dos pacientes (8).

Em estudo recente conduzido nos EUA, 46% das pessoas que apresentavam lombalgia inflamatória, o sintoma inicial mais frequente, foram diagnosticadas com EpA axial. Os pacientes apresentavam a queixa em média por 14 anos (9).

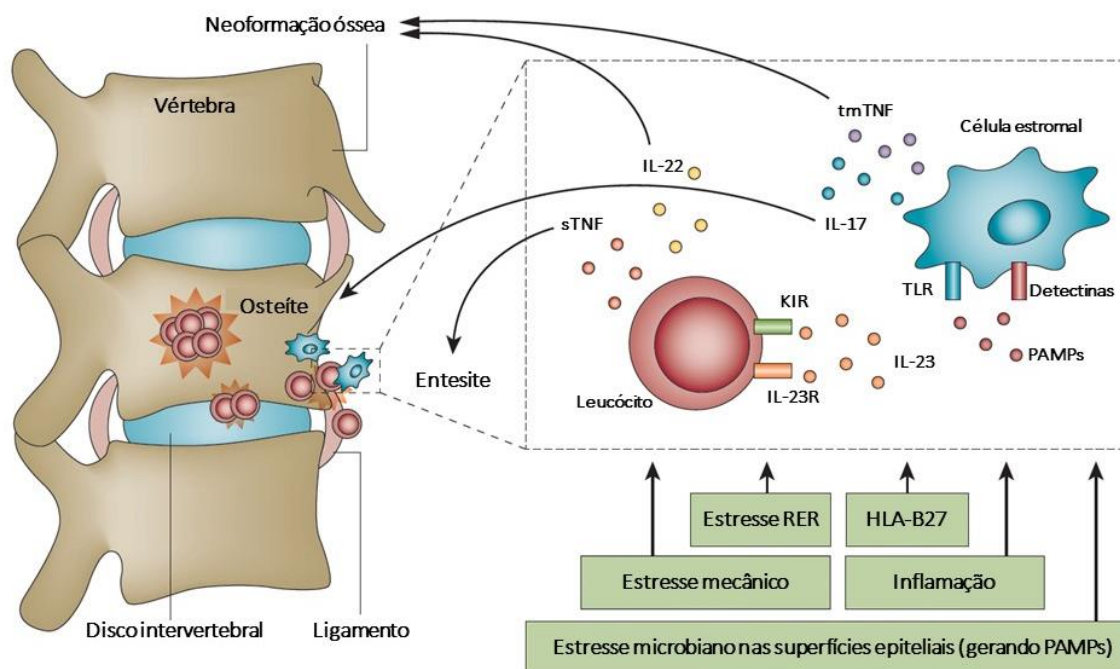
1.3 PATOGENESE E FISIOPATOLOGIA

1.3.1 Conceitos Gerais

Fatores ambientais e estresse celular interligados, associados a predisponentes genéticos, estimulam a transcrição de citocinas e de seus receptores (10).

As citocinas são um grupo heterogêneo de proteínas solúveis que regulam as respostas celulares a diferentes estímulos (11). Na EA há uma produção elevada de citocinas inflamatórias pelas células dos tecidos acometidos, culminando em lesão tecidual, alteração da arquitetura e comprometimento permanente da função fisiológica (Figura 1) (10).

Figura1: Conceitos gerais da fisiopatologia das espondiloartrites.



Interação de fatores genéticos, em particular HLA-B27, com diferentes tipos de estresse (incluindo estresse mecânico, estresse do retículo endoplasmático rugoso (RER), estresse microbiano nas superfícies epiteliais), estimulando a produção de citocinas pro-inflamatórias (sTNF- α , tmTNF- α , IL-22, IL-23, IL-17) pelos leucócitos e células estromais em sítios específicos

dos tecidos acometidos, como a medula óssea e às inserções ligamentares nas vértebras. Destas citocinas, a IL-17 e o fator de necrose tumoral alfa solúvel (sTNF- α) são considerados potentes indutores da inflamação sistêmica. O TNF- α transmembrana (tm TNF- α) e a IL-22 podem agir simultaneamente estimular a neoformação óssea, levando a anquilose das articulações axiais. TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL: interleucina; IL-23R: IL-23 receptor; KIR: *killer cell immunoglobulin-like receptor*; TLR: *toll-like receptor*; PAMPs: moléculas associadas a estresse molecular derivadas de patógenos (10).

1.3.2 Genética

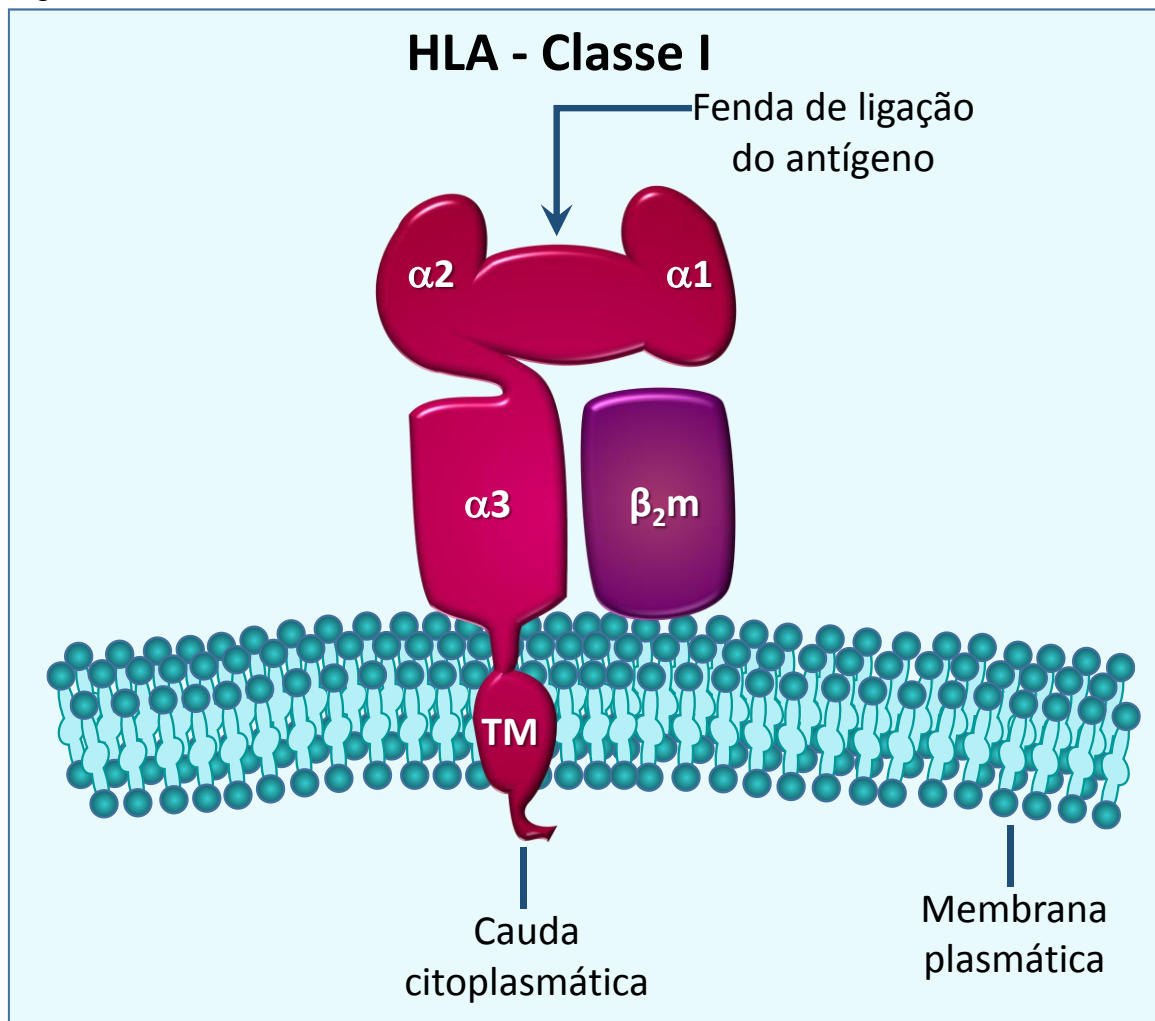
1.3.2.1 Complexo principal de histocompatibilidade tipo 1 (MHC tipo1): Conceitos e funções

O MHC é um conjunto de genes extremamente polimórficos localizados no cromossomo 6, que codificam duas grandes classes de receptores heterodiméricos responsáveis pela regulação da resposta imune (12).

Nos humanos estas proteínas são chamadas de HLA, que estruturalmente são glicoproteínas de membrana plasmática produzidas no RER de todas as células nucleadas e são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T (LT) (13). Os LT citotóxicos (LT CD8+) são responsáveis pela imunidade celular contra vírus e tumores, reconhecendo antígenos (Ag) acoplados no HLA de classe I; os LT auxiliares (LT CD4+) auxiliam a imunidade celular e humoral e reconhecem Ag acoplados no HLA de classe II (13).

Na classe I, existem três subtipos principais de produtos gênicos: HLA-A, HLA-B e HLA-C. Todas as moléculas possuem uma cadeia pesada alfa (onde fica a fenda de ligação com o Ag), uma cadeia leve chamada de beta-2 microglobulina e uma porção transmembrana (Figura 2) (13).

Figura 2: Estrutura do HLA classe 1.

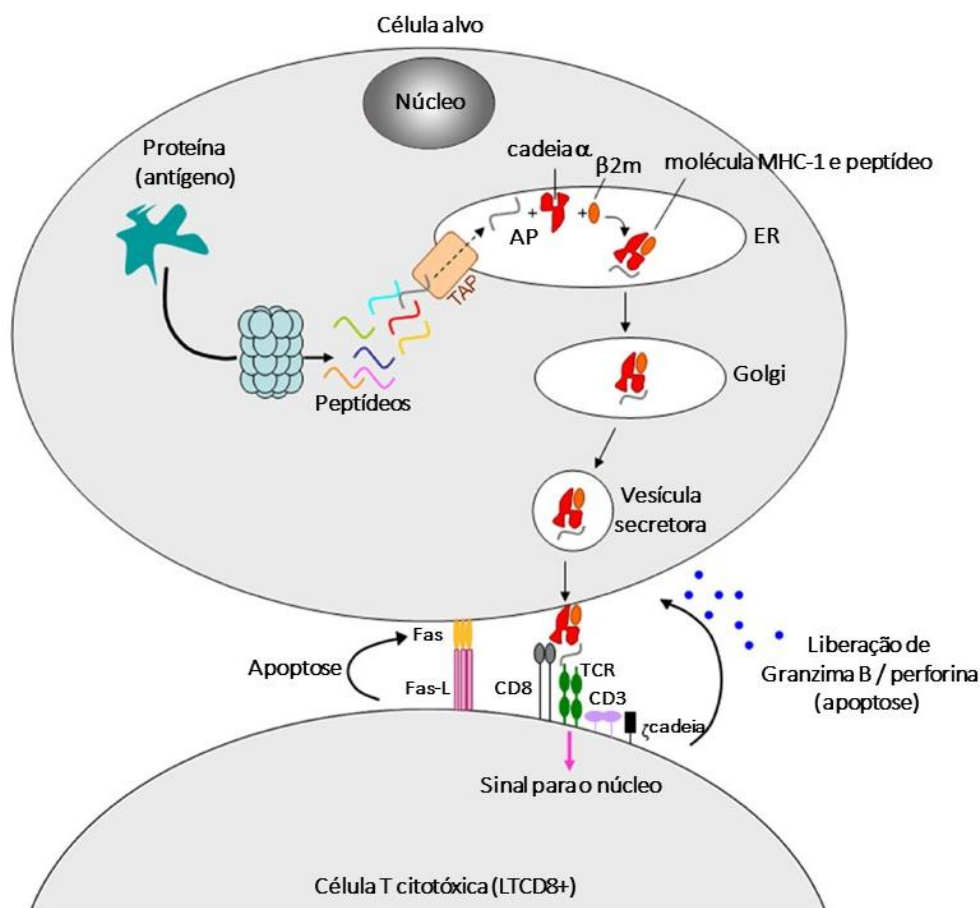


Receptor heterodimérico com duas cadeias. Cadeia pesada α (em vermelho) com a fenda de ligação ao antígeno e a estrutura TM; Cadeia leve β (em roxo). Abreviaturas: MP, membrana plasmática; TM, transmembrana. β_{2m} , beta 2 microglobulina.
 Fonte: Klein J, Sato A. N Engl J Med. 2000;343(10):702-9.

A função do HLA classe I é apresentar peptídeos derivados de todas as células nucleadas aos LT CD8⁺ para reconhecimento de proteínas próprias e não próprias como parte da resposta imune adaptativa (13). As moléculas internalizadas através da membrana plasmática são inicialmente processadas pelo proteossomo, gerando peptídeos. Estes peptídeos são transportados para o RER onde as longas cadeias de aminoácidos são clivadas por moléculas chamadas de aminopeptidases (AP), tornando-as compatíveis com a fenda de ligação do HLA (14). Após esta etapa inicial, normalmente ocorre o acoplamento e subsequente migração do complexo HLA-Ag para a superfície celular e o reconhecimento desta estrutura pelo LT CD8⁺ através da ligação com seu receptor. Isto resulta na tolerância aos peptídeos endógenos e resposta

citotóxica aos peptídeos exógenos como os presentes nas bactérias e nos vírus (Figura 3) (15).

Figura 3: Processamento intracelular de proteínas e apresentação de antígenos para o LTCD8+ através do MHC de classe I.



Proteína internalizada através da MP e processada em peptídeos no proteossomo. Estes peptídeos são transportados, através do TAP, para o interior do RER e são processados pelas AP em moléculas compatíveis com a fenda de ligação do HLA-classe I. A cadeia do HLA-classe I é sintetizada no RER e liga-se ao Ag dentro da organela. O complexo HLA-Ag, migra para superfície celular, onde o Ag é apresentado para o LTCD8+. Abreviaturas: MP, membrana plasmática; TAP, transportador de peptídeos; RER, retículo endoplasmático rugoso; AP, aminopeptidases; HLA, *human leukocyte antigen*; Ag, antígeno; LTCD8+, linfócito T citotóxico (13).

O HLA-B27 é um HLA classe I, assim como as outras moléculas do grupo, é um gene extremamente polimórfico (16). Atualmente são conhecidos 105 subtipos, entre os quais os mais comumente associados a EA são o HLA-B*27:05 (caucasianos), HLA-B*27:02 (populações de origem mediterrânea) e o HLA-B*27:04 (chineses) (16). Existe uma forte associação entre a presença do HLA-B27 e a EA (17). Esta relação foi inicialmente descrita em 1972 e

posteriormente confirmada por estudos genéticos, constatando-se que a prevalência do gene é maior na população caucasiana (17).

O melhor método para detecção dos alelos é pela técnica de amplificação de DNA chamada *polymerase chain reaction* (18, 19).

1.3.2.2 Hipóteses do papel do HLA-B27 na EA

Pode ocorrer alteração no processamento intracelular das proteínas internalizadas pela membrana plasmática.

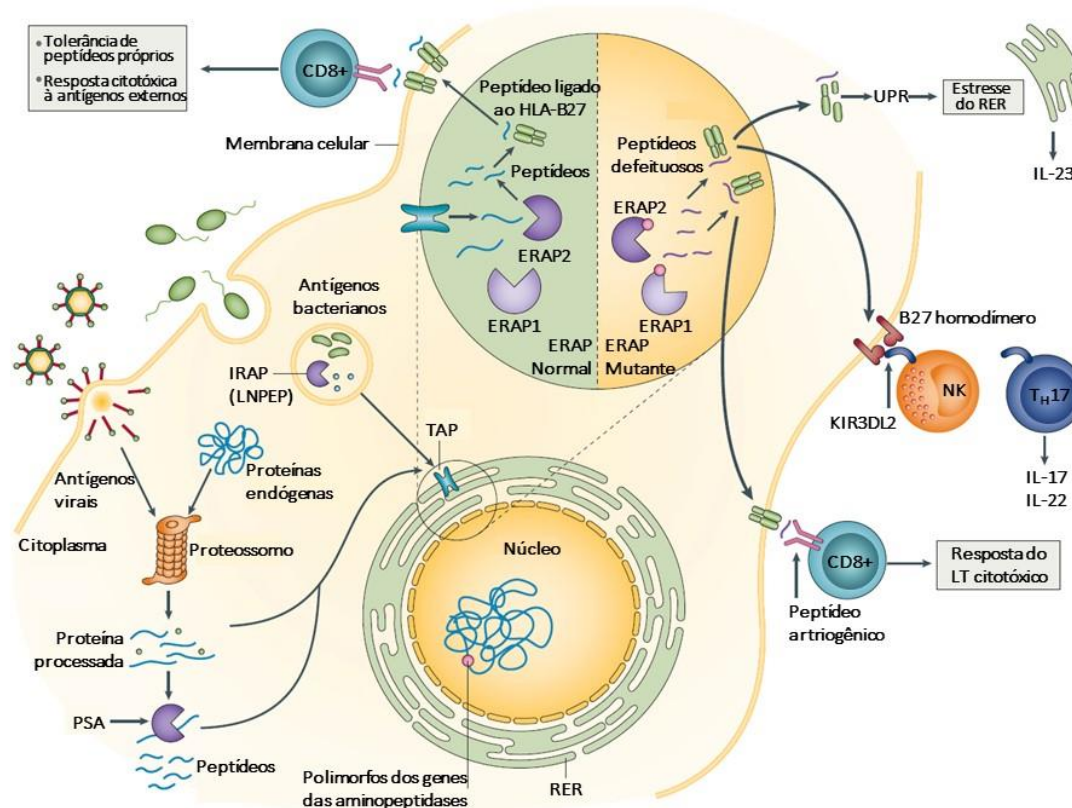
Na EA foram descritos polimorfismos nos genes de algumas AP, resultando em alterações estruturais, entre elas a ERAP 1 (*encoding endoplasmic reticulum aminopeptidase*) e a ERAP 2 (20).

A mutação e variabilidade nestas AP, gera moléculas proteicas anormais que na presença do HLA-B27 resulta em uma interação modificada com as células de defesa (21). O que está modificado nesta sinalização entre receptor e Ag ainda é objeto de estudo. Especula-se que a simples apresentação desde "peptídeo anormal", também chamado peptídeo artritogênico (PA), geraria uma resposta citotóxica dos LT às células dos tecidos acometidos pela doença (enteses e osso subcondral) (Figura 4).(21)

Outra teoria é que a cadeia do HLA-B27 é susceptível à modificação estrutural, com a formação de um homodímero de duas cadeias pesadas na membrana celular. Esta estrutura perderia a especificidade para o receptor do LT CD8+ e seria compatível com receptores de outras células apresentadoras de antígenos, como as células *natural killer* (NK), e também dos LTCD4+, ativando-as sem a necessidade de ligação prévia com um Ag, gerando uma resposta inflamatória pluricelular e portanto mais ampla, liberando citocinas proinflamatórias (22) (figura 4).

A molécula HLA-B27 pode ter defeitos na sua estrutura terciária ainda durante o processamento no RER, comprometendo o microambiente da organela, desencadeando uma resposta chamada *unfolded protein response* (UPR) que seria um gatilho para o início de uma cascata inflamatória, culminando com a produção de IL-23 (22, 23) (figura 4).

Figura 4: Fisiopatologia da espondilite anquilosante: Relações entre polimorfismos genéticos, presença do HLA-B27, interação com células do sistema imunológico e produção de citocinas.



Entre os fatores de risco genéticos estão os polimorfismos das AP (ERAP1 e ERAP2), gerando peptídeos de conformação estrutural alterada (PA), e a presença do HLA-B27. Estão descritos 3 mecanismos patogênicos do papel do HLA-B27 na indução de resposta inflamatória. Primeiro, apresentação de um PA para o LTCD8+, gerando uma resposta citotóxica. Segundo, formação de HLA-B27 com cadeias homodiméricas, estruturalmente compatíveis com receptores de vários tipos celulares, ativando células apresentadoras de antígenos, células NK, LTCD8+ e LTCD4+. Terceiro, moléculas de HLA-B27 sofrem alteração espacial da sua molécula dentro do RER, gerando uma resposta inflamatória na organela com produção de IL-23 (UPR). Abreviaturas: AP, aminopeptidases. ERAP, aminopeptidase do retículo endoplasmático. PA, peptídeo artritogênico. LT, linfócito T. NK, *natural killer*. IL, interleucina. UPR: *unfolded protein response* (24).

Existe uma hipótese, ainda sem comprovação em estudos *in vivo*, que os indivíduos portadores do HLA-B27, teriam mais dificuldade em processar e eliminar peptídeos de bactérias intracelulares no intestino, alterando a microbiota local e perpetuando a resposta inflamatória, ao manter a apresentação destes Ag às células do sistema imune (24).

O real papel do HLA-B27 na apresentação de Ag no intestino é desconhecido, mas a alteração na imunidade na mucosa intestinal tem relação com a fisiopatologia da EA.

Estudos revelaram que 5-10% dos pacientes com EA tem DII associada e que 70% tem inflamação subclínica na mucosa intestinal (24). As células do sistema imune residentes e circulantes são sensíveis a ativação através da IL-23 e esta citocina é abundante no íleo terminal dos pacientes com EA (24).

Todas estas interações entre o HLA-B27 e as células de defesa, assim como alterações no micro ambiente celular e no processamento intracitoplasmático de antígenos, culminam com a formação de citocinas inflamatórias na EA.

1.3.3 Citocinas e Espondilite Anquilosante

As evidências mais atuais indicam que a IL-23 é a principal molécula gerada neste estímulo inflamatório inicial. Na EA ocorre polimorfismo do receptor da IL-23 (IL-23R), com aumento da sua expressão e distribuição (25). Assim, esta citocina ativa diretamente várias linhagens celulares, como neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dentríticas e células NK.

A IL-23 é um membro da família da IL-12, por compartilharem estruturas moleculares semelhantes (26). A IL-12 também tem um papel fundamental na regulação das respostas imunológicas, mas tem uma função diferente da IL-23 ao agir de forma mais específica nos LT CD4+, estimulando sua diferenciação em células Th1 (26).

A ativação de LT CD4+ através do IL-23R, induz a expressão de um fenótipo conhecido como Th17 (27). Estas células produzem IL-17 e outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1beta (IL-1 β) e IL-6 (27).

A IL-17 induz várias respostas entre elas a lesão da matriz óssea e da matriz cartilaginosa (27).

O TNF- α foi originalmente descrito como uma molécula que causava apoptose de células tumorais e necrose destes tecidos (28). Esta proteína de 26kDa é expressa na superfície celular, onde é clivada por metaloproteinases, liberando uma forma solúvel e mantendo uma forma ligada à membrana plasmática, ambas biologicamente ativas. O TNF- α gera suas respostas ao se ligar em 2 tipos de receptores diferentes, o receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) e o receptor 2 do fator de necrose tumoral (TNFR2) (28).

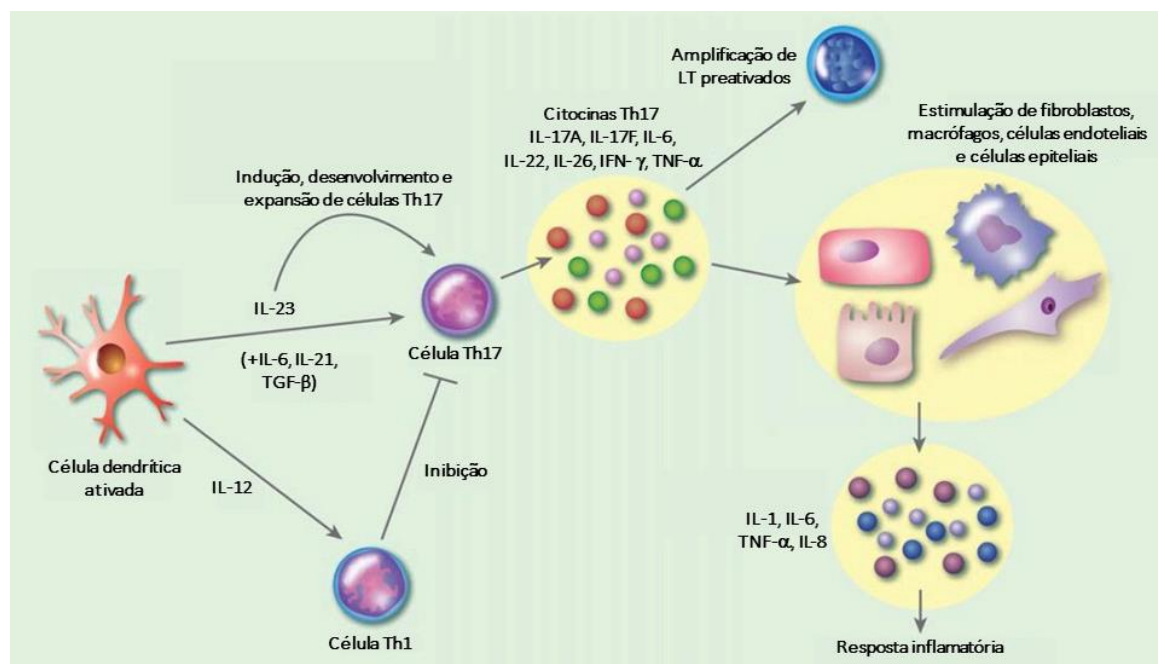
A IL-6 tem uma ação protagonista na inflamação por induzir a síntese de proteínas de fase aguda, além de estimular a diferenciação e a expansão clonal de linfócitos B, auxiliando a produção de imunoglobulinas (29). As principais fontes de IL-6 são fagócitos mononucleares e LTCD4+ ativados e o nível sérico elevado da citocina tem sido observado em pacientes com EA em atividade (30).

Análises imunohistoquímicas dos tecidos inflamados na artrite reumatóide e nas EpA, demonstraram um infiltrado celular com predominância de células da imunidade inata, principalmente macrófagos (31). Na EA macrófagos ativados são uma importante fonte de TNF- α , IL-8 e IL-1 β (31). Pouco se conhece qual forma de TNF- α (ligado à membrana ou solúvel) e qual receptor (TNFR1 ou TNFR2) está predominantemente implicado na patogênese da EA (31). Existem poucos estudos sobre a biologia da IL-1 nas EpA, mas níveis elevados no soro e nas articulações sacroilíacas foram previamente descritos na EA (32). A IL-8 contribui para inflamação crônica, estimulando a angiogênese e induzindo a expressão de integrinas que agem como fatores quimiotáticos para neutrófilos (33).

Além das citocinas pró-inflamatórias citadas, os macrófagos também são uma importante fonte de IL-10 (31). Ela é produzida como parte de uma resposta de tolerância imunológica, equilibrando a inflamação, ao estimular fatores de transcrição que inibem a produção de citocinas pelos macrófagos e monócitos (34). Ainda não está claro se existe uma alteração na expressão da IL-10 nas EpA. Alguns estudos demonstraram que esta resposta anti-inflamatória pode estar desregulada na EA (35).

Esta heterogeneidade celular gera uma resposta inflamatória intensa, com a liberação de uma grande variedade de citocinas pro-inflamatórias que interagem de forma sinérgica, lesando tecidos, expandindo o número de células ativadas e perpetuando a inflamação (Figura 5) (27).

Figura 5: Produção de citocinas na espondilite anquilosante.



Fonte: Jethwa, 2016 (27)

1.3.4. Inflamação e lesão tecidual na espondilite anquilosante

Na EA o tecido alvo da expressão destes eventos imunológicos e genéticos são primariamente as enteses (36). Estruturas fibrosas e fibrocartilaginosas que fazem a ligação e fixação de tendões, ligamentos, fâscias e cápsulas articulares ao osso em todos os sítios do sistema esquelético (36). Estudos em modelos animais demonstraram que as células locais têm a particularidade de responder rapidamente à IL-23 devido a uma maior concentração do IL-23R (37). As enteses estão sujeitas a micro danos frequentes devido ao estresse mecânico em que estão constantemente submetidas (37). Isto desencadeia uma resposta reparativa com formação de osteóide para manter a integridade da ligação, que num contexto de predisposição genética e ambiente pro-inflamatório, ocorre amplificação dos eventos com entesite crônica e neoformação óssea exuberante (sindesmófitos) (37).

Na EA o acometimento predominante da coluna vertebral e de estruturas articulares e ligamentares dos membros inferiores, ocorre provavelmente devido ao fato de suportarem mais carga do que os outros sítios, além das forças de

estiramento a que normalmente estão submetidas, sendo mais susceptíveis a lesões.

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Na EA caracteristicamente ocorre inflamação da coluna vertebral, das articulações sacrílicas e das enteses.

O sintoma clínico inicial mais comum é a lombalgia de padrão inflamatório (LPI) (38), caracterizada por dor na região lombar, geralmente iniciando antes dos 40 anos de idade, de evolução insidiosa, que melhora com exercícios e piora com o repouso articular; a dor pode ser noturna e acordar o paciente, melhorando ao levantar-se da cama (39).

A inflamação no esqueleto axial geralmente começa nas articulações sacroilíacas (sacroiliíte), com um padrão evolutivo ascendente para toda a coluna vertebral e suas estruturas ligamentares, articulares e disco intervertebral (40). O desfecho é a ossificação progressiva dos tecidos fibrosos, evoluindo para anquilose dos espaços articulares, comprometendo gravemente a mobilidade, gerando deformidades articulares irreversíveis, alterações posturais e causando dor intensa (40, 41).

A entesite pode ocorrer em vários sítios simultaneamente, o que causa dor difusa e mal definida (42).

Os pacientes podem ter artrite periférica e dactilite. A artrite geralmente é assimétrica, oligoarticular e de membros inferiores (42). A dactilite é a inflamação das pequenas articulações e estruturas periarticulares causando edema difuso dos quírodáctilos ou pododáctilos (42).

As manifestações extra articulares mais prevalentes são a uveíte anterior, a psoríase e as DII respectivamente (43). Nos pacientes HLA-B27 positivos existe uma tendência maior para complicações cardiovasculares como a insuficiência aórtica, distúrbios de condução cardíaca e inflamação da aorta ascendente (44). Com o advento de novos métodos diagnósticos, estudos mais recentes têm associado à EA alterações no parênquima pulmonar e renal, assim como raros casos de desmielinização (45).

As manifestações clínicas da EA estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Manifestações clínicas da espondilite anquilosante

Características Clínicas da EpA axial	Definição
Lombalgia de padrão inflamatório	LPI : 4 de 5 dos seguintes parâmetros presentes 1. Idade de início <40 anos 2. Início insidioso 3. Melhora com exercício 4. Sem melhora com repouso 5. Dor noturna (com melhora ao levantar-se)
Artrite	Sinovite ativa no passado ou no presente, diagnosticada por médico
Entesite	Entesite no calcânhar: dor ou sensibilidade espontânea ao exame da região da inserção do tendão de Aquiles ou da fâscia plantar
Dactilite	Dactilite no passado ou no presente, diagnosticada por médico
Uveíte anterior	Uveíte anterior no passado ou no presente, confirmada por oftalmologista
Psoríase	Psoríase no presente ou no passado, diagnosticada por médico
Doença inflamatória intestinal	Doença de Crohn ou colite ulcerativa no passado ou no presente, diagnosticada por médico
Boa resposta a antiinflamatório não hormonal (AINH)	24-48h após dose total de um AINH, dor lombar com melhora significativa ou ausente

Fonte: adaptado de Sieper, 2009 (39)

1.5 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico de EA é feito na presença de uma combinação de critérios clínicos, laboratoriais e radiológicos.

Por muitos anos o diagnóstico foi baseado exclusivamente nos critérios de Nova York modificados de 1984, em que é obrigatória a presença de lesão óssea das articulações sacroilíacas radiologicamente visível no Raio X (46) (figura 6). O diagnóstico de EA é definido na presença de 01 critério radiológico associado a pelo menos 01 critério clínico (46).

Figura 6: Critérios Classificatórios da EA.

Espondilite Anquilosante Critérios Modificados de New York (1984)

1. Critérios Clínicos:

a. Lombalgia e rigidez articular por mais de 3 meses, que melhoram com exercício, mas não com repouso.

b. Limitação da mobilidade da coluna lombar nos planos sagital e frontal.

c. Limitação da expansibilidade torácica comparado ao normal, em relação à idade e ao sexo.

2. Critério Radiológico:

Sacroiliíte grau ≥ 2 bilateral ou grau 3-4 unilateral

Espondilite Anquilosante Definida se o critério radiológico estiver associado a no mínimo 1 critério clínico.

van der Linden S et al. Arthritis Rheum 1984; 27: 361



EA definida: 01 critério radiológico associado a pelo menos 01 critério clínico. * Características radiológicas das articulações sacroilíacas no RX (grau de SI): Grau 0 – Normal; Grau 1- SI suspeita ou duvidosa; Grau 2 – esclerose óssea do sacro e do íliaco, irregularidades dos contornos articulares e erosões ósseas; Grau 3 – alterações verificadas no grau 2, associadas ao pseudoalargamento articular; Grau 4: anquilose (fusão total) articular. Abreviaturas: SI, sacroiliíte (47)

Rudwaleit e cols. publicaram uma nova classificação em 2009, com o objetivo de fazer o diagnóstico precoce (fase pré radiológica), possibilitando o tratamento antes que lesões definitivas e deformidades existam (48). Estes novos critérios foram chamados de critérios classificatórios do grupo ASAS (Assessment of SpondyloArthritis international Society) (48) (figura 7). O grupo ASAS é formado por pesquisadores e especialistas em EpA com o objetivo de estudar exclusivamente estas doenças.

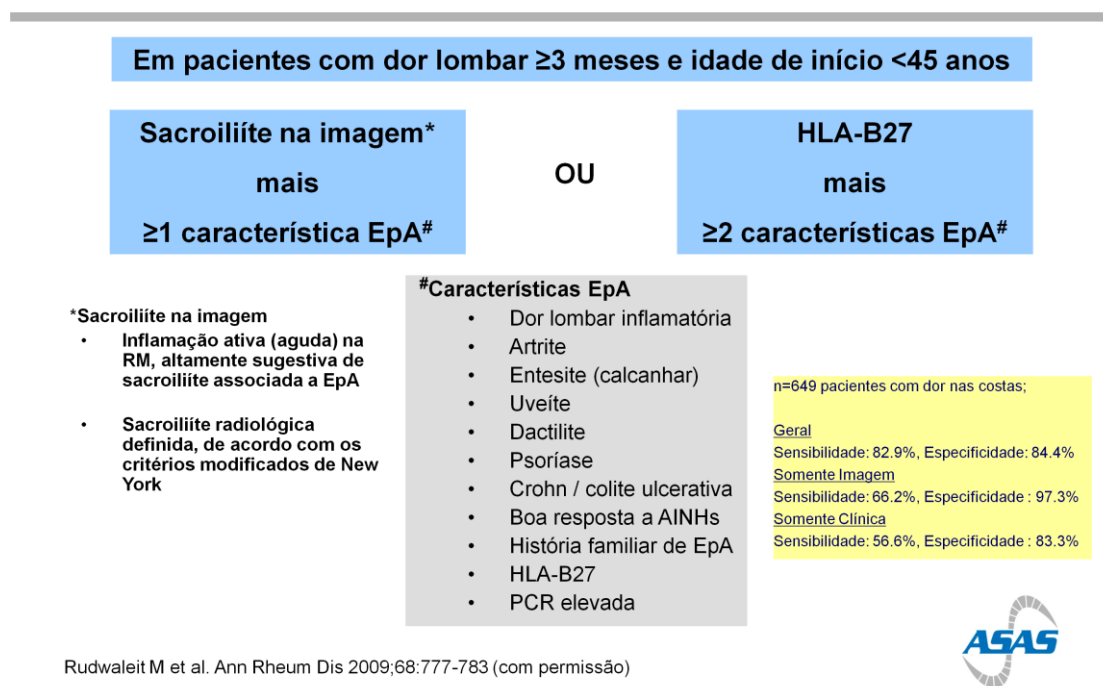
Os critérios classificatórios do ASAS são a presença de LPI iniciada antes dos 45 anos de idade, com duração mínima de pelo menos 03 meses, associada à sacroiliíte (SI) em exame de imagem e pelo menos 01 característica típica das EpA; ou lombalgia iniciada antes dos 45 anos de idade por três meses, associada a presença do HLA-B27 e pelo menos 02 características típicas das EpA (49) (figura 7).

As características clínicas típicas das EpA são LPI, artrite periférica (geralmente assimétrica e de membros inferiores), entesite, uveíte, dactilite, boa resposta aos AINhs, ter DII e a história familiar positiva para EpA (49). A presença do HLA-B27 é um marcador genético importante e a elevação da Proteína C reativa (PCR) é um achado laboratorial (49).

Para o diagnóstico de EA por estes novos critérios, é indispensável a presença de SI em um exame de imagem; seja por alterações anatômicas visíveis no raio X, conforme descrita nos critérios de Nova York modificados ou SI ativa (edema ósseo) evidenciada em ressonância nuclear magnética (RNM), conforme os critérios do grupo ASAS (49). A EA é o protótipo da doença com padrão de acometimento axial, geralmente comprometendo as articulações sacroilíacas simetricamente.

Figura 7: Critérios classificatórios das EpA axiais.

Espondiloartrite Axial Critérios Classificatórios do grupo ASAS



Diagnóstico de EA: LPI associada a SI em exame de imagem (RX ou RNM) mais ≥1 característica de EpA. Abreviaturas: EpA, espondiloartrites; ASAS, Assessment of SpondyloArthritis international Society; EA, espondilite anquilosante; LPI, lombalgia de padrão inflamatório; SI, sacroiliíte; RX, raio X. RNM, ressonância nuclear magnética (50)

1.6 INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os instrumentos de avaliação e acompanhamento clínico da EA são o BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)(51) (ANEXO A) e ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) (52) (ANEXO B) para estimar a atividade da doença. O BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index) avalia o impacto do comprometimento da função articular causada pela EA, com escore de 0-10, quanto maior o valor pior a função (53) (ANEXO C) . O ASQoL (Ankylosing Spondylitis Quality of Life) avalia a qualidade de vida através de 18 perguntas em que o paciente responde “sim” ou “não”, recebendo 1 ponto para a resposta sim; o escore varia de 0-18, quanto maior o escore, pior a qualidade de vida (54) (ANEXO D). A avaliação global do paciente (AGP), que faz parte do ASDAS, é realizada através de uma escala visual de dor com escores possíveis de 0-100mm; quanto maior o escore, pior a AGP. (ANEXO B). Estes instrumentos foram validados para a língua portuguesa em um trabalho da universidade de São Paulo (USP) e publicados na revista brasileira de reumatologia (55, 56).

Estes instrumentos são importantes para quantificar de forma padronizada e reproduzível a atividade da doença, o grau de limitação para realizar as atividades habituais e o impacto da doença na vida dos pacientes. Esta padronização permite avaliar as respostas aos tratamentos instituídos e fazer comparações entre protocolos de pesquisa em relação a diferentes estratégias terapêuticas, além de permitir a otimização do manejo clínico de acordo com a resposta individual dos pacientes.

Usamos 02 índices de avaliação que são objetivos, isto é, são calculados baseados em achados do exame físico através de manobras e técnicas aplicadas pelo médico examinador. O BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrologic Index) avalia o grau de comprometimento da mobilidade do esqueleto axial (57). Este índice é composto por 5 medidas de amplitude articular, incluindo o teste de rotação cervical, o teste de Schober modificado, a distância trago-parede, a medida de flexão lateral lombar e a distância intermaleolar. O escore varia de 0-10. Quanto maior o escore, pior a mobilidade axial (ANEXO E).

O MASES (Maastricht Akylosing Spondylitis Enthesitis Score) é um índice que descreve e quantifica a entesite. São palpados 13 pontos de inserção

ligamentar pré definidos. A pontuação varia de 0 (zero), se ausência de dor, até 13 se dor em todos os sítios investigados (58). (ANEXO F.)

1.7 TRATAMENTO

O Tratamento da EA é baseado em recomendações elaboradas por grupos de especialistas reunidos em sociedades internacionais e nacionais. São os principais pesquisadores e estudiosos das EpA, com um grande número de publicações na área. O EULAR (the european league against rheumatism) e o grupo ASAS se reuniram e publicaram as diretrizes de tratamento e diagnóstico mais respeitadas e seguidas no mundo todo. No Brasil os especialistas estão reunidos na sociedade brasileira de reumatologia, que tem diretrizes próprias baseadas nas recomendações internacionais e adaptadas para a realidade nacional e para o perfil dos pacientes brasileiros.

1.7.8 Tratamento não Farmacológico

Na EA é muito importante que o paciente se mantenha ativo fisicamente. Os diferentes programas de reabilitação postural e muscular são significativamente eficazes em diminuir a perda função articular, em reduzir os índices de atividade da doença e em melhorar a qualidade de vida. (59, 60).

Procedimentos cirúrgicos podem ser necessários em uma fase mais avançada da evolução clínica. Artroplastia total de quadril e osteotomia corretiva da coluna vertebral são técnicas usadas na presença de dano estrutural grave para correção de deformidades incapacitantes (61).

1.7.9 Tratamento Farmacológico

Ao contrário da artrite reumatóide, na EA as opções terapêuticas são mais restritas, pois poucas medicações estão disponíveis para o tratamento da inflamação das enteses e articulações relacionadas a coluna vertebral. Isto porque as drogas modificadoras do curso de doença (DMCD) são muito eficazes para a artrite periférica, mas a resposta nos sítios axiais não foi superior ao placebo. (62) A sulfassalazina e o metotrexate são DMCD que podem ser usados

no comprometimento articular periférico, mas não controlam a progressão da doença na coluna vertebral (63) (64).

Os AINHS ainda são as drogas de primeira linha para o tratamento da EpA axial (65). Reduzem os sintomas, controlando de forma eficaz a inflamação e retardam a progressão radiológica das lesões axiais, ou seja, evitam deformidades. Para inibir danos estruturais, o uso contínuo em dose plena é 03 vezes mais eficaz do que o uso sob demanda (somente se dor). (66). Este regime contínuo de tratamento, pode ser um limitante importante em pacientes cujas comorbidades não permitam o uso dos AINHS por tempo prolongado.

A SI tem excelente resposta à injeção intraarticular de corticoesteróides (CE). O acetado de triamcinolona foi muito eficaz nos estudos, com resolução da lombalgia acrescida da redução do uso de AINHS e da melhora radiológica (67, 68). Esta técnica exige disponibilidade de tomógrafo, aparelho de RNM e profissionais treinados para execução do procedimento.

O uso de CE sistêmicos não é recomendado para tratamento da inflamação axial, por falta de evidências que avaliem a eficácia e devido aos efeitos colaterais a longo prazo (3).

As drogas que bloqueiam a ação do TNF, são chamadas de anti-TNF. Revolucionaram o tratamento da doença por serem uma alternativa aos AINHS. Estão disponíveis comercialmente cinco medicações (infliximabe, etanercepte, adalimumabe, golimumabe e certolizumabe) que são igualmente eficazes em reduzir a atividade inflamatória, agindo nos sítios axiais, nas articulações periféricas e nas enteses (69). Atualmente são indicados como a primeira escolha na EpA axial após falha dos AINHS ou nos pacientes em que estes estão contraindicados (70). Apesar de terem sido um avanço no tratamento da EA, os anti-TNF possuem limitações como a intolerância ao uso da medicação, a perda de eficácia ao longo do tratamento, podem falhar em atingir a remissão da doença e não evitam a progressão dos danos estruturais quando iniciados na fase radiográfica da doença (70, 71).

2 JUSTIFICATIVAS

A importância do investimento em estudos com a espondilite anquilosante vem da relativa frequência da doença, aliada ao fato de acometer indivíduos jovens, em idade produtiva. Ela é responsável por maiores taxas de desemprego, de comprometimento funcional musculoesquelético e de falta ao trabalho em relação à população geral (72).

Atualmente existem poucas opções de tratamento liberados para uso clínico. A lesão axial não responde às DMCDs usadas na artrite reumatóide. O arsenal terapêutico é restrito aos AINHS e medicamentos anti-TNF. O melhor entendimento da fisiopatologia e dos mecanismos imunológicos possibilitará o conhecimento de novos alvos terapêuticos na doença, com potencial melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Não existem estudos na população brasileira que avaliem o perfil de citocinas dos pacientes com EA. A correlação dos níveis de citocinas pro e anti-inflamatórias com parâmetros de atividade clínica (tanto axiais quanto periféricas) da EA é também pouco conhecida no nosso meio.

3 HIPÓTESES

3.1 HIPÓTESE CONCEITUAL

A concentração sérica de citocinas pró e anti-inflamatórias difere em pacientes com EA e controles saudáveis. Existe associação entre concentrações de citocinas e instrumentos de avaliação clínica na EA.

3.2 HIPÓTESE OPERACIONAL

A concentração sérica pró e anti-inflamatórias não difere em pacientes com EA e controles saudáveis. Não existe associação entre concentrações de citocinas e instrumentos de avaliação clínica na EA.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

- 1) Avaliar o perfil de citocinas pro e anti-inflamatórias em pacientes com espondilite anquilosante e controles saudáveis.
- 2) Correlacionar concentrações de citocinas com instrumentos de avaliação clínica da doença.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os níveis das citocinas IL-12, IL-6, TNF- α , IL-1B, IL-8, IL-17, IL-23 e IL-10 em pacientes com EA e controles saudáveis.
- 2) Averiguar associação entre uso de anti-TNF com concentrações de citocinas e variáveis clínicas em pacientes com EA.

5 MATERIAIS E METODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal controlado.

5.2 POPULAÇÃO EM ESTUDO

5.2.1 Casos

Os pacientes foram recrutados consecutivamente conforme a agenda do ambulatório de espondiloartrites do serviço de reumatologia do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Os indivíduos foram selecionados através dos critérios classificatórios para espondilite anquilosante pelos critérios de Nova York modificados (46) e/ou pelos critérios classificatórios do grupo ASAS para EpA axial (48).

Os pacientes elegíveis tinham idade entre 26 e 70 anos, aceitaram participar voluntariamente do estudo através do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram excluídos pacientes com psoríase, história de doença inflamatória intestinal, infecções ativas, com diagnóstico de neoplasia nos últimos cinco anos e outras doenças concomitantes que causem imunodepressão ou inflamação ativa.

5.2.2 Controles

Os controles saudáveis foram aleatoriamente incluídos entre a população de doadores do banco de sangue da PUCRS, conforme a demanda espontânea e por ordem de chegada.

Os voluntários foram pareados com os pacientes por sexo e idade, esclarecidos que uma amostra do sangue doado seria usada em pesquisa e assinaram o TCLE para o grupo controle. Além dos critérios de exclusão para doar sangue, foram obedecidos os mesmos critérios de exclusão dos pacientes.

5.2.3 Metodologia

Durante a visita o (a) paciente foi avaliado (a) pela pesquisadora, com esclarecimento e assinatura do TCLE, preenchimento da ficha de coleta de dados, avaliação clínica e coleta de sangue.

O diagnóstico de cada paciente foi conferido através da revisão dos registros do prontuário e na conferência dos exames de imagem e exames laboratoriais no arquivo digital do hospital.

Os instrumentos de avaliação clínica foram a contagem articular (articulações com artrite), a contagem de enteses dolorosas (MASES), medida da expansão torácica, as cinco medidas que avaliam a mobilidade axial componentes do BASMI (flexão lateral lombar, flexão lombar ou teste de Schober modificado, distância intermaleolar máxima, distância trago-parede e ângulo de rotação cervical), AGP, cálculo do BASDAI e do BASFI, aplicação do ASQoL e o cálculo do ASDAS. A mesma pesquisadora avaliou clinicamente todos os pacientes.

Para quantificação das citocinas, efetuamos a coleta de 20mL de sangue periférico em tubo com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*). O plasma foi isolado após centrifugação durante 10 minutos na velocidade de 1800 rpm à temperatura ambiente. Após, as amostras foram congeladas em criotubos à temperatura de -80oC para posterior análise.

A IL-23 foi quantificada, de acordo com instruções do fabricante, com o *Kit* ELISA (Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima) *Human IL-23* (catálogo KHC0231) comercializado pela Life Technologies.

As citocinas IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, TNF- α , IL-12p70 foram quantificadas por citometria de fluxo, conforme instruções do fabricante, utilizando o *Kit CBA* (*cytometer bead array inflammatory*) comercializado pela BD BioScience (catálogo 551811). Para quantificar a citocina IL-17A utilizamos um *kit CBA Flex Set* (catálogo 560383) em conjunto com o *Human Soluble Protein Master Buffer Kit* (catálogo 558265). As análises foram feitas utilizando o *software* FCAP array (BDbioscience) e os resultados foram expressos em pg/mL.

Foi realizada a dosagem sérica de PCR pelo método de química seca (mg/dL; valor de referência: inferior a 1,0 mg/dL).

A coleta de sangue dos pacientes foi realizada no dia da avaliação clínica e a amostra dos controles foi separada no dia da doação de sangue. O material foi processado no mesmo dia e armazenado.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética e Científico do HSL da PUCRS.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa PEPI versão 4.0 e baseado nos estudos de (Xueyi et al., 2013) (73) e (Bautista-Caro et al., 2013) (74). Para um nível de significância de 5% ($P < 0,05$), poder de 95% e um tamanho de efeito de no mínimo um desvio padrão, obteve-se um total mínimo de 28 indivíduos por grupo em estudo.

As variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartílica. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e relativas.

Para comparar médias entre os grupos, o teste t-student foi aplicado. Em caso de assimetria, o teste de Mann-Whitney foi aplicado. Na comparação de proporções, o teste qui-quadrado de Pearson foi utilizado.

As associações entre as variáveis quantitativas foi avaliada pelos coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman. As relações entre as variáveis foram analisadas através de covariância (ANCOVA).

6 RESULTADOS

A amostra foi composta por 32 pares paciente-controle, sendo a média de idade dos pacientes de 46,9 anos ($\pm 10,7$) e dos controles de 46,6 ($\pm 9,7$). A predominância foi do sexo masculino (n=19; 59,4%).

Entre os 32 pacientes, 30 preencheram critérios diagnósticos de EA segundo os critérios de Nova York modificados e 2 tinham diagnóstico de EpA axial segundo os critérios do ASAS (foram incluídos somente os pacientes com SI simétrica na RNM e que não apresentassem outras características das EpA associadas como DII, psoríase ou artrite reativa). A mediana do tempo de doença foi de 18 anos .

A informação quanto a presença do alelo HLA-B27 pode ser aferida em 24 dos 32 pacientes. Dezesete apresentavam HLA-B27. A grande maioria dos pacientes eram caucasianos, exceto uma paciente que era parda.

Documentamos entesite em 27 pacientes (84.5%), com uma mediana de 4,5 sítios dolorosos no MASES. Constatamos artrite periférica em 3 pacientes (9%).

Em relação à atividade de doença, foi possível aplicar o índice BASDAI para todos dos pacientes e o índice ASDAS PCR em 30 pacientes. Não foi possível avaliar 02 pacientes com a última ferramenta por erro laboratorial ao realizar o teste PCR. Todos os pacientes avaliados pelo ASDAS PCR estavam com a doença ativa (valor $\geq 1,3$) enquanto 16 pacientes (50%) estavam com a doença ativa usando o BASDAI (valor ≥ 4). As medianas do ASQoL e AGP revelaram moderada qualidade de vida. As medianas do BASFI e do BASMI foram compatíveis com um baixo a moderado comprometimento da função articular e da mobilidade axial respectivamente.

A maioria dos pacientes estava recebendo tratamento medicamentoso, sendo que 21 (65,6%) usavam anti-TNF, 12 (37,5%) anti-inflamatório, 9 (28,1%) prednisona, 10 (31,3%) metotrexate e 4 (12,5%) sulfassalazina. A mediana do tempo de uso de anti-TNF foi de 3 anos (2 – 5).

As características demográficas e clínicas dos pacientes estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Características demográficas e clínicas dos pacientes com EA.

Variável	n=32
Idade (anos) – média ± DP	46,9 ± 10,7
Sexo masculino – n (%)	19 (59,4)
Raça Branca – n (%)	31 (96,9)
Espondiloartrite Axial – n (%)	
Critérios de Nova York para EA	30 (93,7)
Critérios ASAS para EpA axial	2 (6,3)
Tempo de doença (anos) - mediana (P25 – P75)	18 (10 – 31)
Entesite – n (%) / mediana de pontos dolorosos (P25 – P75)*	27 (84,4%) /4,5 (1-6)
Artrite – n (%)	3 (9,4)
HLA-B27 – n (%)	
Presente	17/24 (70,8)
Ausente	7/24 (29,2)
BASDAI - mediana (P25 – P75)	3,9 (2,1-6,3)
BASDAI ≥ 4 – n(%)	16 (50,0)
ASDAS PCR - mediana (P25 – P75)	2,9 (2,3 – 3,5)
ASDAS PCR – n(%)	
Doença inativa (< 1,3)	0/30 (0)
Atividade moderada (1,3 a 2,1)	6/30 (20,0)
Atividade elevada (2,1 a 3,4)	15/30 (50,0)
Atividade muito elevada (≥ 3,5)	9/30 (30,0)
BASFI - mediana (P25 – P75)**	4 (1,3 – 6,0)
BASMI 10 - mediana (P25 – P75)***	3,4 (2,3 – 4,2)
ASQoL - mediana (P25 – P75)****	8,0 (5,3 – 10,8)
AGP - mediana (P25 – P75)*****	44,5 (21,3 – 60,0)

*Entesite: análise de 13 pontos dolorosos padronizados no índice de MASES com escore de 0-13; quanto maior o valor, mais sítios dolorosos. **BASFI: avalia o impacto do comprometimento da função articular causada pela EA, com escores de 0-10; quanto maior o valor, pior a função. ***BASMI 10: escore que avalia a mobilidade axial, com escores de 0-10; quanto mais próximo de 10, pior a mobilidade axial. ****ASQoL: total de 18 perguntas relacionadas à qualidade de vida, em que o paciente responde “sim” ou “não”, recebendo 1 ponto para a resposta “sim”; o escore varia de 0-18; quanto maior o escore, pior a qualidade de vida. *****AGP: avaliação global do paciente baseada em escala visual com escores possíveis de 0-100mm; quanto maior o escore, pior a AGP.

A concentração das citocinas no plasma foi comparado entre os grupos de pacientes e controles (Tabela 3). A diferença foi significativa para os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-8 (figura 8), que estavam mais elevados nos pacientes com EA em relação aos controles saudáveis. A citocina supressora IL-10 também estava significativamente mais elevada nos pacientes.

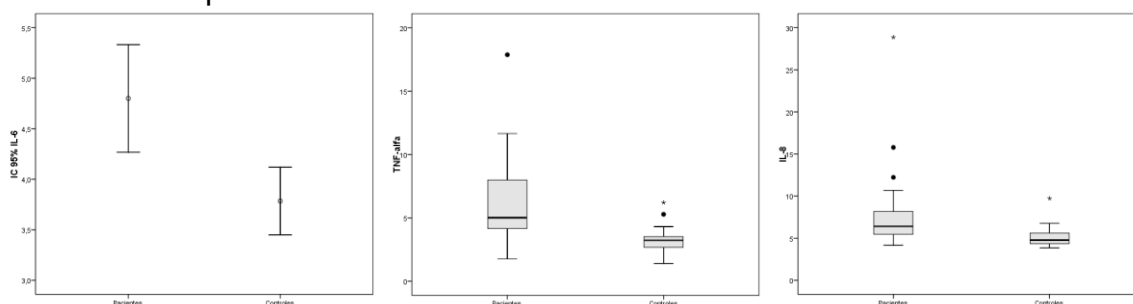
Tabela 3: Comparação da concentração de citocinas (pg/mL) entre pacientes e controles.

Variáveis [#]	Pacientes (n=32)	Controles (n=32)	p
IL-12	3,14 (1,88 – 4,89)	4,33 (3,90 – 5,38)	0,071*
IL-6	4,80 ± 1,40	3,78 ± 0,88	0,003**
IL-10	2,58 ± 0,85	2,13 ± 0,53	0,032**
TNF- α	5,01 (3,68 – 7,77)	3,23 (2,67 – 3,57)	<0,001*
IL-1 β	59,6 ± 18,4	60,3 ± 12,8	0,882**
IL-8	6,33 (5,46 – 8,14)	4,77 (4,34 – 5,73)	<0,001*
IL-23	267 ± 81,2	242 ± 99,5	0,252**
IL-17	6,20 ± 0,88	6,23 ± 0,71	0,902**

[#] descritas por mediana (percentis 25-75) ou média \pm desvio padrão; * Teste de Wilcoxon ** Teste t-student para amostras pareadas

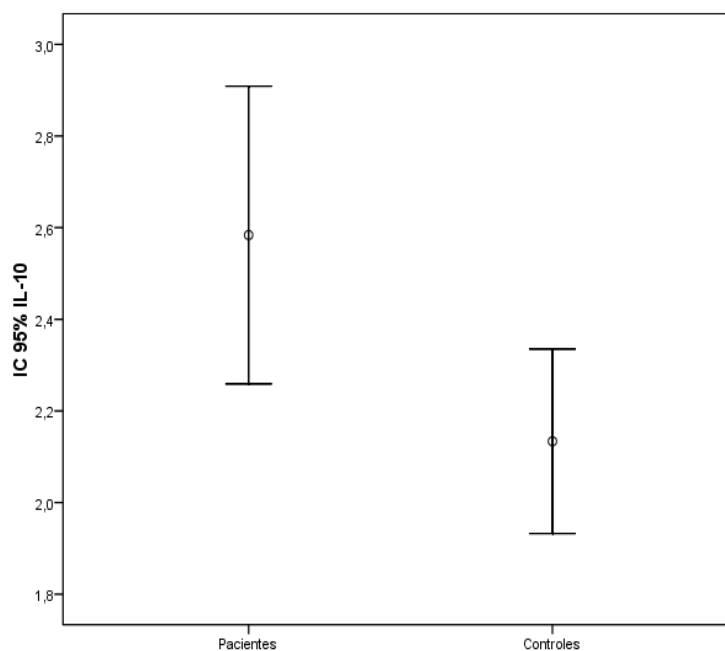
A Figura 8 ilustra as concentrações médias das citocinas IL-6, TNF- α e IL-8 em pacientes e controles.

Figura 8: Distribuição gráfica da comparação das concentrações de IL-6, TNF- α e IL-8 entre pacientes e controles.



A Figura 9 ilustra a concentração média da citocina IL-10, em pacientes e controles.

Figura 9: Distribuição gráfica da comparação das concentrações de IL-10 entre pacientes e controles.



Avaliamos também a correlação entre as concentrações das citocinas e as variáveis clínicas (Tabela 4). Houve correlação significativa entre concentrações de IL-6 e BASMI. Para as demais associações (outras citocinas e outras variáveis clínicas) não houve correlação nem significativa e nem limítrofe ($p > 0,10$).

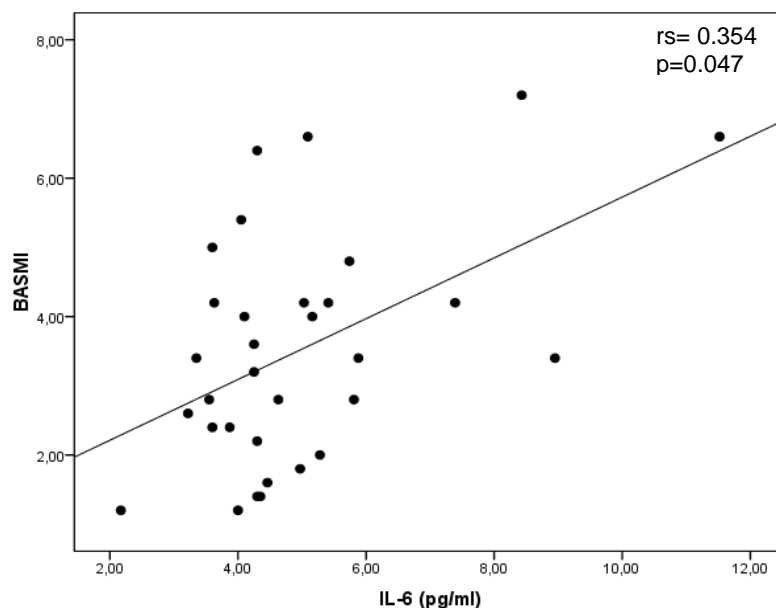
Tabela 4: Correlações entre citocinas e variáveis clínicas através do coeficiente de Spearman

Variáveis	BASMI	BASDAI	MASES	ASDAS PCR	BASFI	AV Global	AsQoI
IL-12	0,167	0,057	-0,051	0,268	0,045	-0,266	-0,006
IL-6	0,354*	-0,070	-0,097	0,099	0,286	0,012	0,229
IL-10	-0,109	-0,072	-0,012	-0,086	-0,043	-0,200	0,052
TNF- α	0,161	0,085	-0,048	0,114	0,133	0,129	-0,040
IL-1 β	0,101	0,081	0,081	0,188	0,076	0,142	0,223
IL-8	0,159	-0,087	0,052	0,046	0,075	-0,008	0,319
IL-23	0,146	0,042	0,229	-0,101	0,172	-0,138	0,271
IL-17	-0,080	-0,057	-0,210	-0,030	-0,350	-0,165	-0,177

* $p=0,047$ (significativo)

A Figura 10 demonstra a correlação significativa entre concentrações de IL-6 e BASMI.

Figura 10: Correlação das concentrações de IL-6 com o BASMI ($r_s=0.354$, $p=0.047$, Spearman test).



Procedemos uma subanálise, associando uso de anti-TNF com concentração de citocinas. Observamos que a concentração das citocinas avaliadas não diferiu significativamente entre usuários e não usuários de anti-TNF após ajuste para fatores de confusão (Tabela 5).

Tabela 5: Associações entre usuários e não usuários de anti-TNF e concentrações séricas de citocinas em pacientes com espondilite anquilosante

Variáveis [#]	Usuários anti-TNF ^{***} (n=21)	Não usuários anti-TNF (n=11)	p	pajustado ^{##}
IL-12	3,74 (1,84 – 4,98)	2,52 (1,86 – 4,73)	0,639*	0,828
IL-6	5,37 ± 1,89	4,17 ± 1,58	0,081**	0,912
IL-10	2,52 ± 1,02	2,45 ± 0,46	0,839**	0,771
TNF- α	5,61 (3,29 – 8,78)	4,59 (4,15 – 5,41)	0,238*	0,239
IL-1 β	61,0 ± 19,8	54,1 ± 13,6	0,307**	0,448
IL-8	6,42 (5,50 – 8,01)	6,25 (4,71 – 9,99)	0,611*	0,198
IL-23	289,7 ± 80,2	226,9 ± 69,3	0,048**	0,384
IL-17	6,28 ± 1,02	6,03 ± 0,34	0,338**	0,479

[#]descritas por mediana (percentis 25-75) ou média \pm desvio padrão; *Teste de Mann-Whitney; **Teste *t-student* para amostras independentes; ##ajustado para tempo de doença, BASMI, BASFI, ASQol pela Análise de Covariância (ANCOVA); ***Mediana do tempo de uso de anti-TNF foi de 3 anos (2 – 5).

Avaliamos também a associação entre usuários ou não de anti-TNF com instrumentos de avaliação clínica. O uso de anti-TNF foi associado a um BASMI elevado (pior mobilidade axial) e a uma pior qualidade de vida mensurada pelo ASQoL (Tabela 6).

Tabela 6: Associação entre uso de anti-TNF e variáveis clínicas

Variáveis [#]	Usa anti-TNF (n=21)	Não usa anti-TNF (n=11)	P
Idade	49,1 ± 12,7	47,7 ± 9,7	0,757**
Tempo de doença	22 (13,5 – 31)	9 (7 – 25,3)	0,140*
BASMI	4 (2,5 – 4,9)	2,6 (1,6 – 3,2)	0,042*
BASDAI	3,8 (2,1 – 5,9)	4,6 (2,6 – 7,3)	0,389*
MASES	4 (1 – 6)	5 (1 – 10)	0,367*
ASDASPCR	2,8 (2,0 – 3,7)	2,9 (2,5 – 3,5)	0,800*
BASFI	4,9 (1,8 – 6,5)	3,6 (0,3 – 5,2)	0,113*
AGP	47 (21,5 – 60)	30 (21 – 60)	0,667*
ASQoL	8 (7 – 11)	5 (1 – 8)	0,009*
Presença de HLAB27	12 (75,0)	5 (62,5)	0,647***

[#] descritas por mediana (percentis 25-75) ou n(%); * teste de Mann-Whitney ** Teste t-student para amostras independentes *** teste qui-quadrado de Pearson.

7 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o perfil de citocinas no plasma dos pacientes com EA e sua associação com instrumentos clínicos. Esta abordagem exclusiva para EA é inédita na América Latina.

Epidemiologicamente evidenciamos que nossos pacientes são mais semelhantes aos europeus em relação a etnia (75), com 96,9% de brancos. Nossa casuística teve 59,4% de homens; em outro estudo brasileiro (de 2001), o predomínio do sexo masculino em EA (84,4%) foi ainda mais evidente (76).

Em termos clínicos, o comprometimento axial esteve presente em todos os pacientes, uma vez que constitui critério diagnóstico obrigatório da EA. Por sua vez, revelou-se chamativa a baixa frequência de artrite periférica em nossa casuística (somente 3 pacientes, 9,4%).

Em contrapartida, verificamos uma elevada prevalência de entesite nos nossos pacientes (27 indivíduos, 84,4%), com uma mediana de pontos dolorosos ao exame físico superior a 4 sítios. Em estudo comparativo de populações latino-americanas e europeias, a presença de entesite ocorreu em 54% dos latino-americanos e 38% dos europeus com EA (77), dados inferiores aos nossos em termos de frequência.

Sabidamente pacientes com EA são HLA-B27 positivos em sua grande maioria. Dados do norte da Europa indicam prevalência de HLA-B27 de 90% dos casos de EA (75). Em nosso estudo, embora predominasse também a população caucasiana, a prevalência do referido alelo foi menor (70.8%).

Um estudo brasileiro que recrutou pacientes com EpA (incluindo as cinco regiões do país e vinte e oito centros universitários) demonstrou EA em 73,3% do total de casos; destes, 69,5% apresentavam o alelo HLA-B27, dado semelhante ao nosso. A prevalência de raça branca (59,5%), entretanto, foi inferior àquela obtida em nosso estudo. O comprometimento puramente axial foi mais raro, predominando um padrão misto (axial, artrite periférica e entesites) (78).

Detectamos um BASFI médio de 4,0 e BASDAI médio 3,9, achados compatíveis com comprometimento funcional moderado e doença ativa. Em outro estudo nacional, o BASFI médio foi de 4,53 e o BASDAI de 4,12, dados que também demonstram comprometimento funcional e doença em atividade (79).

Até o presente momento, nenhum estudo nacional avaliara a atividade da doença através do ASDAS PCR; da mesma forma não havia dados disponíveis acerca da avaliação da mobilidade axial pelo índice BASMI 10 e da qualidade de vida através do ASQoL. O ASDAS PCR se mostrou bastante sensível para apontar doença ativa em nossa casuística: foi alterado em 100% dos pacientes, enquanto 50% se mostraram ativos quando avaliados pelo BASDAI.

Em relação ao tratamento da EA é de interesse mencionar que 65,6% dos nossos pacientes usavam anti-TNF e 37,5% AINH. Este achado significa uma mudança de paradigma terapêutico: de acordo com dados nacionais de 2010, apenas 5,4% dos pacientes estavam sob terapia anti-TNF, enquanto 77% faziam uso de AINH (79). Estas diferenças estão relacionadas a eficácia comprovada dos agentes anti-TNF na EA (80) e ao acesso universal a estes fármacos no sistema de saúde público brasileiro.

Os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-8 foram significativamente mais elevados nos pacientes em comparação a controles pareados por sexo e idade. Este achado reflete uma ativação celular persistente do sistema imunológico, o que mantém um ambiente pró-inflamatório nesta afecção. Entretanto, nem todas as citocinas pró-inflamatórias se mostraram elevadas em nossos pacientes com EA: os níveis de IL-1 β , IL-12p70, IL-23 e IL-17 não diferiram em casos e controles. O fato de algumas citocinas inflamatórias, mas não outras, estarem elevadas no sangue de pacientes com EA demanda estudos mais detalhados no futuro.

A presença de níveis elevados de IL-6 e do TNF- α é reconhecida na EA já há alguns anos (81). Altas concentrações de IL-8, em consonância com nossos achados, também já foram previamente reportados na EA (82).

O TNF- α desempenha importante papel na inflamação relacionada a EA. A sua produção está significativamente aumentada nestes pacientes e agentes anti-TNF promovem melhora clínica significativa na maioria dos casos (83). Uma grande variedade de células sintetiza TNF- α , e praticamente todas as células nucleadas humanas expressam receptores para esta citocina; entretanto, desconhece-se quais destas células estão patologicamente hipersecretoras e quais receptores desencadeiam sinais moleculares alterados em indivíduos com EA (84).

Praticamente não documentamos artrite periférica nos nossos pacientes, enquanto constatamos entesite na maioria deles. Estudos em humanos e

modelos animais demonstraram que agentes anti-TNF são extremamente eficazes em induzir a remissão da sinovite periférica de maneira sustentada, evitando deformidades ósseas (85). O bloqueio do TNF- α é eficaz em controlar a entesite, mas talvez a longo prazo este efeito não se mantenha, o que sugere a existência de outras vias imunológicas (86).

A IL-6 é uma citocina pleotrófica, desempenhando papel fisiológico variado, incluindo ativação de linfócitos T, diferenciação de linfócitos B, regulação da inflamação e das respostas de fase aguda (87). A concentração desta citocina é geralmente elevada em pacientes com doenças inflamatórias ou autoimunes (87). Além disso, observa-se correlação entre a sua concentração e a presença de marcadores laboratoriais de atividade inflamatória, como PCR e velocidade de hemossedimentação (VHS) (88). Níveis elevados de IL-6 foram previamente descritos na EA, com associação positiva com plaquetometria, parâmetros clínicos e níveis de PCR (81).

Concentrações elevadas de IL-8 tem sido reportadas com frequência na EA, mesmo em pacientes sob tratamento com AINH (89). Nossos dados, embora confirmassem uma elevação de IL-8 em relação a controles, não demonstraram correlação desta citocina com o BASDAI, ASDAS PCR ou outros instrumentos de avaliação clínica.

Na inflamação crônica observada na EA, macrófagos ativados pelo TNF- α são secretores de IL-8 (90). A IL-8 é um potente agente quimiotático para neutrófilos e ativador neutrofílico, estimulando a exocitose de grânulos pré-formados (91). A IL-8 também induz o estresse oxidativo ao ativar a enzima NADPH-oxidase, com subsequente formação de radicais livres derivados do oxigênio (92).

Esta especificidade para estimular os neutrófilos classifica a IL-8 como uma das quimiocinas, moléculas cuja produção é estimulada por outros mediadores inflamatórios; são compostos de ação rápida e que atuam em alvos celulares específicos, perpetuando assim a resposta inflamatória (93). É possível que o aumento dos níveis de IL-8 aqui encontrados decorra das altas concentrações de TNF- α e da retroalimentação da cascata inflamatória, não configurando um achado primário da EA.

As concentrações de IL-10, citocina anti-inflamatória, foram também significativamente elevadas em nossos pacientes com EA. Este é um achado

intrigante, podendo representar uma resposta supressiva à inflamação ou um efeito do tratamento. O bloqueio medicamentoso do TNF- α pode induzir a hiperexpressão de IL-10 em LT CD4+ humanos, através da regulação de fatores de transcrição (94). Estudos em populações chinesas também demonstraram aumento da IL-10 na EA (95, 96), achado não reproduzido em casuística mexicana (97).

A expressão e a secreção da IL-10 são geneticamente determinadas, e a sua associação com a suscetibilidade e gravidade na EA em diferentes populações é, no momento, objeto de estudo (98).

No que concerne à correlação de citocinas com parâmetros de avaliação clínica, o único dado estatisticamente significativo que obtivemos foi a relação dos níveis de IL-6 com o BASMI. Um achado de grande interesse, já que este índice avalia seletivamente a mobilidade axial.

A inflamação ativa na coluna vertebral, detectada como edema ósseo na RNM, influencia negativamente a mobilidade axial (99). Ao demonstrar correlação positiva entre os níveis de IL-6 e BASMI, nosso estudo sugere que mediadores sistêmicos influenciam parâmetros axiais.

O estudo de Falkenbach e Herold, publicado em 1998, já demonstrara que a concentração de IL-6 está associada a uma restrição de mobilidade axial (100). As variáveis distância occipito-parede e dedo-chão, assim como a rotação cervical, estavam individualmente correlacionadas com os níveis de IL-6. De forma inédita demonstramos que o índice composto BASMI, gerado por 5 medidas clínicas, manteve esta associação. Nosso estudo demonstra, possivelmente de forma original, a correlação de níveis de IL-6 com um índice-padrão composto de cinco medidas axiais. Em concordância com o relato de Bal et al (101), não obtivemos correlação de níveis de IL-6 com outros índices de atividade da doença e qualidade de vida.

A partir dos nossos achados, pode-se especular que a IL-6 funcione como um potencial biomarcador da restrição da mobilidade axial, já que a correlação foi obtida mesmo sob influência de terapia anti-TNF e anti-inflamatória. Novos estudos são necessários para definir se uma mudança de estratégia terapêutica teria impacto na redução dos níveis de IL-6 e na melhora mobilidade axial a longo prazo.

Aproximadamente dois terços dos nossos pacientes com EA estavam em uso de algum agente anti-TNF. Interessantemente, o perfil de citocinemia não diferiu em usuários e não-usuários de agentes anti-TNF mesmo após ajuste para variáveis clínicas. Infere-se, a partir destes dados, que o uso de bloqueadores de TNF- α , embora clinicamente eficaz, não modifica o perfil sérico de citocinas e tampouco influencia a produção de citocinas paralelas.

Digno de nota, a concentração do próprio TNF- α não diferiu em usuários e não-usuários de terapia anti-TNF, demonstrando que a dosagem sérica da citocina bloqueada não permitiu discriminar os dois grupos de pacientes.

Comparativamente ao grupo de não-usuários, os pacientes sob terapia anti-TNF apresentaram menor mobilidade axial e pior qualidade de vida, respectivamente avaliados pelo BASMI e ASQoL. Longa duração de doença (mediana de 18 anos), presença de deformidades axiais e de artrose secundária de quadris podem ter contribuído para este achado.

Nosso estudo apresenta limitações, principalmente o pequeno tamanho amostral (32 pacientes). A principal razão para tal compreendeu nossa decisão de excluirmos pacientes com outras EpA, incluindo apenas casos de EA. Esta decisão permitiu, por outro lado, resultados e conclusões mais específicas para EA. O delineamento transversal constituiu entrave para ilações de causa-efeito, sendo outra limitação de nosso estudo.

8 CONCLUSÕES

Os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α , assim como da citocina anti-inflamatória IL-10, foram aumentados em pacientes com EA em relação a controles sadios.

Houve correlação entre concentração sérica da IL-6 e BASMI, o que sugere a participação desta citocina na fisiopatologia da morbidade axial.

Usuários de anti-TNF apresentaram definida restrição da mobilidade axial e pior qualidade de vida.

O papel das citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como sua relação com índices de atividade (em particular a correlação da IL-6 com índices axiais) compreende campo aberto a comprovações. Se conclusões neste contexto implicarão em mudanças ou novas propostas terapêuticas, é também matéria para discussões futuras.

REFERÊNCIAS

1. Rudwaleit M. New approaches to diagnosis and classification of axial and peripheral spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22(4):375-80.
2. Garg N, van den Bosch F, Deodhar A. The concept of spondyloarthritis: where are we now? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28(5):663-72.
3. Sampaio-Barros PD, Keiserman M, Meirelles Ede S, Pinheiro Mde M, Ximenes AC, Azevedo VF, et al. Recommendations for the management and treatment of ankylosing spondylitis. *Rev Bras Reumatol*. 2013;53(3):242-57.
4. Seipp MT, Erali M, Wies RL, Wittwer C. HLA-B27 typing: evaluation of an allele-specific PCR melting assay and two flow cytometric antigen assays. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;63(1):10-5.
5. Zhang S, Li Y, Deng X, Huang F. Similarities and differences between spondyloarthritis in Asia and other parts of the world. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(4):334-8.
6. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(4):650-7.
7. Bakland G, Nossent HC. Epidemiology of spondyloarthritis: a review. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(9):351.
8. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 2007;369(9570):1379-90.
9. Deodhar A, Mease PJ, Reveille JD, Curtis JR, Chen S, Malhotra K, et al. Frequency of axial spondyloarthritis diagnosis among patients seen by United States rheumatologists for evaluation of chronic back pain. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2016.
10. Sieper J, Braun J, Dougados M, Baeten D. Axial spondyloarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015:15013.
11. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(1):37-45.

12. Maenaka K, Jones EY. MHC superfamily structure and the immune system. *Curr Opin Struct Biol.* 1999;9(6):745-53.
13. Cebrián C, Loike JD, Sulzer D. Neuronal MHC-I expression and its implications in synaptic function, axonal regeneration and Parkinson's and other brain diseases. *Front Neuroanat.* 2014;8:114.
14. Grommé M, Neefjes J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol.* 2002;39(3-4):181-202.
15. Chemali M, Radtke K, Desjardins M, English L. Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(9):1533-41.
16. Khan MA. Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15(10):362.
17. McHugh K, Bowness P. The link between HLA-B27 and SpA--new ideas on an old problem. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51(9):1529-39.
18. Lucotte G, Burckel A. DNA typing of HLA-B27 by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* 1997;11(4):313-5.
19. Bonnaud G, Aupetit C, Preux PM, Cogné M, Drouet M. Optimisation of HLA-B27 testing by association of flow cytometry and DNA typing. *Clin Rheumatol.* 1999;18(1):23-7.
20. Haroon N, Tsui FW, Chiu B, Tsui HW, Inman RD. Serum cytokine receptors in ankylosing spondylitis: relationship to inflammatory markers and endoplasmic reticulum aminopeptidase polymorphisms. *J Rheumatol.* 2010;37(9):1907-10.
21. Smith JA. Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15(1):489.
22. Bowness P. HLA-B27. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:29-48.
23. Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol.* 2014;57(1):44-51.

24. Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis- insights into pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(2):81-91.
25. Duan Z, Pan F, Zeng Z, Zhang T, Wang S, Li G, et al. Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2012;32(5):1209-14.
26. Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(1):40-52.
27. Jethwa H, Bowness P. The interleukin (IL)-23/IL-17 axis in ankylosing spondylitis: new advances and potentials for treatment. *Clin Exp Immunol*. 2016;183(1):30-6.
28. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008;214(2):149-60.
29. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16(5):448-57.
30. Falkenbach A, Herold M, Wigand R. Interleukin-6 serum concentration in ankylosing spondylitis: a reliable predictor of disease progression in the subsequent year? *Rheumatol Int*. 2000;19(4):149-51.
31. Ambarus C, Yeremenko N, Tak PP, Baeten D. Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(4):351-8.
32. Amarasekara DS, Yu J, Rho J. Bone Loss Triggered by the Cytokine Network in Inflammatory Autoimmune Diseases. *J Immunol Res*. 2015;2015:832127.
33. Skov L, Beurskens FJ, Zachariae CO, Reitamo S, Teeling J, Satijn D, et al. IL-8 as antibody therapeutic target in inflammatory diseases: reduction of clinical activity in palmoplantar pustulosis. *J Immunol*. 2008;181(1):669-79.
34. Al-Robaee AA, Al-Zolibani AA, Al-Shobili HA, Kazamel A, Settin A. IL-10 implications in psoriasis. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2008;2(1):53-8.
35. Stebbings SM, Taylor C, Tannock GW, Baird MA, Highton J. The immune response to autologous bacteroides in ankylosing spondylitis is

- characterized by reduced interleukin 10 production. *J Rheumatol*. 2009;36(4):797-800.
36. McGonagle D, Gibbon W, Emery P. Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. *Lancet*. 1998;352(9134):1137-40.
 37. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, et al. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR-gamma+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat Med*. 2012;18(7):1069-76.
 38. Rudwaleit M, Khan MA, Sieper J. The challenge of diagnosis and classification in early ankylosing spondylitis: do we need new criteria? *Arthritis Rheum*. 2005;52(4):1000-8.
 39. Sieper J, van der Heijde D, Landewe R, Brandt J, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, et al. New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):784-8.
 40. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*. 2002;61 Suppl 3:iii8-18.
 41. El Maghraoui A. Extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: prevalence, characteristics and therapeutic implications. *Eur J Intern Med*. 2011;22(6):554-60.
 42. van der Horst-Bruinsma IE, Nurmohamed MT, Landewe RB. Comorbidities in patients with spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012;38(3):523-38.
 43. Stolwijk C, van Tubergen A, Castillo-Ortiz JD, Boonen A. Prevalence of extra-articular manifestations in patients with ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(1):65-73.
 44. Grewal GS, Leipsic J, Klinkhoff AV. Abdominal aortitis in HLA-B27+ spondyloarthritis: case report with 5-year follow-up and literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;44(3):305-8.
 45. Carron P, Van Praet L, Van den Bosch F. Peripheral manifestations in spondyloarthritis: relevance for diagnosis, classification and follow-up. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(4):370-4.

46. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984;27(4):361-8.
47. ASAS. ASAS slide library 2016 [1.0.2:[Available from: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=criterios+new+york>. Acesso dia 27 de Junho de 2016.
48. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(6):777-83.
49. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, Brandt J, Braun J, Burgos-Vargas R, et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68 Suppl 2:ii1-44.
50. ASAS. ASAS Slide library 2016 [1.0.2:[Available from: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=&c=ALL&k=classification-criteria>. Acesso dia 27 de Junho de 2016.
51. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994;21(12):2286-91.
52. van der Heijde D, Lie E, Kvien TK, Sieper J, Van den Bosch F, Listing J, et al. ASDAS, a highly discriminatory ASAS-endorsed disease activity score in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(12):1811-8.
53. Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O'Hea J, Mallorie P, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol.* 1994;21(12):2281-5.
54. Doward LC, Spoorenberg A, Cook SA, Whalley D, Helliwell PS, Kay LJ, et al. Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(1):20-6.
55. Cusmanich K. Validação para a língua portuguesa dos instrumentos de avaliação de índice funcional e índice de atividade de doença em pacientes com espondilite anquilosante. Dissertação de Mestrado em Ciências. São

Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.: Banco de Tese Capes; 2006.

56. Sampaio-Barros Percival D, AVF, Bonfiglioli Rubens, Campos Wesley R., Carneiro Sueli Coelho da Silva, Carvalho Marco Antonio P. et al. Consenso Brasileiro de Espondiloartropatias: espondilite anquilosante e artrite psoriásica diagnóstico e tratamento - primeira revisão. *Rev Bras Reumatol* 2007; 47(4):233-42.
57. Jones SD, Porter J, Garrett SL, Kennedy LG, Whitelock H, Calin A. A new scoring system for the Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI). *J Rheumatol.* 1995;22(8):1609.
58. Heuft-Dorenbosch L, Spoorenberg A, van Tubergen A, Landewé R, van der Tempel H, Mielants H, et al. Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(2):127-32.
59. Fernández-de-Las-Peñas C, Alonso-Blanco C, Alguacil-Diego IM, Miangolarra-Page JC. One-year follow-up of two exercise interventions for the management of patients with ankylosing spondylitis: a randomized controlled trial. *Am J Phys Med Rehabil.* 2006;85(7):559-67.
60. Staalesen Strumse YA, Nordvåg BY, Stanghelle JK, Røisland M, Winther A, Pajunen PA, et al. Efficacy of rehabilitation for patients with ankylosing spondylitis: comparison of a four-week rehabilitation programme in a Mediterranean and a Norwegian setting. *J Rehabil Med.* 2011;43(6):534-42.
61. Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, et al. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(6):896-904.
62. van den Berg R, Baraliakos X, Braun J, van der Heijde D. First update of the current evidence for the management of ankylosing spondylitis with non-pharmacological treatment and non-biologic drugs: a systematic literature review for the ASAS/EULAR management recommendations in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51(8):1388-96.
63. Chen J, Veras MM, Liu C, Lin J. Methotrexate for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2:CD004524.
64. Chen J, Lin S, Liu C. Sulfasalazine for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;11:CD004800.

65. Kroon FP, van der Burg LR, Ramiro S, Landewe RB, Buchbinder R, Falzon L, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for axial spondyloarthritis (ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis). *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;7:Cd010952.
66. Wanders A, Heijde D, Landewé R, Béhier JM, Calin A, Olivieri I, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2005;52(6):1756-65.
67. Bollow M, Braun J, Taupitz M, Häberle J, Reibhauer BH, Paris S, et al. CT-guided intraarticular corticosteroid injection into the sacroiliac joints in patients with spondyloarthropathy: indication and follow-up with contrast-enhanced MRI. *J Comput Assist Tomogr.* 1996;20(4):512-21.
68. Braun J, Bollow M, Seyrekbasan F, Häberle HJ, Eggens U, Mertz A, et al. Computed tomography guided corticosteroid injection of the sacroiliac joint in patients with spondyloarthropathy with sacroiliitis: clinical outcome and followup by dynamic magnetic resonance imaging. *J Rheumatol.* 1996;23(4):659-64.
69. Maxwell LJ, Zochling J, Boonen A, Singh JA, Veras MM, Tanjong Ghogomu E, et al. TNF-alpha inhibitors for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;4:CD005468.
70. van der Heijde D, Sieper J, Maksymowych WP, Dougados M, Burgos-Vargas R, Landewe R, et al. 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(6):905-8.
71. Van den Bosch F, Deodhar A. Treatment of spondyloarthritis beyond TNF-alpha blockade. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28(5):819-27.
72. Jacobs P, Bissonnette R, Guenther LC. Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases--focusing on work productivity and disability. *J Rheumatol Suppl.* 2011;88:55-61.
73. Xueyi L, Lina C, Zhenbiao W, Qing H, Qiang L, Zhu P. Levels of circulating Th17 cells and regulatory T cells in ankylosing spondylitis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy. *J Clin Immunol.* 2013;33(1):151-61.

74. Bautista-Caro MB, Arroyo-Villa I, Castillo-Gallego C, de Miguel E, Peiteado D, Puig-Kröger A, et al. Decreased Th17 and Th1 cells in the peripheral blood of patients with early non-radiographic axial spondyloarthritis: a marker of disease activity in HLA-B27⁺ patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(2):352-62.
75. Stolwijk C, Boonen A, van Tubergen A, Reveille JD. Epidemiology of spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012;38(3):441-76.
76. Sampaio-Barros PD, Bertolo MB, Kraemer MH, Neto JF, Samara AM. Primary ankylosing spondylitis: patterns of disease in a Brazilian population of 147 patients. *J Rheumatol*. 2001;28(3):560-5.
77. Benegas M, Muñoz-Gomariz E, Font P, Burgos-Vargas R, Chaves J, Palleiro D, et al. Comparison of the clinical expression of patients with ankylosing spondylitis from Europe and Latin America. *J Rheumatol*. 2012;39(12):2315-20.
78. Sampaio-Barros PD. Epidemiology of spondyloarthritis in Brazil. *Am J Med Sci*. 2011;341(4):287-8.
79. Gallinaro AL, Ventura C, Sampaio Barros PD, Goncalves CR. Spondyloarthritis: analysis of a Brazilian series compared with a large Ibero-American registry (RESPONDIA group). *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(5):581-9.
80. Machado MA, Barbosa MM, Almeida AM, de Araujo VE, Kakehasi AM, Andrade EI, et al. Treatment of ankylosing spondylitis with TNF blockers: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2013;33(9):2199-213.
81. Gratacós J, Collado A, Filella X, Sanmartí R, Cañete J, Llena J, et al. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol*. 1994;33(10):927-31.
82. Azuz-Lieberman N, Markel G, Mizrahi S, Gazit R, Hanna J, Achdout H, et al. The involvement of NK cells in ankylosing spondylitis. *Int Immunol*. 2005;17(7):837-45.
83. Callhoff J, Sieper J, Weiss A, Zink A, Listing J. Efficacy of TNFalpha blockers in patients with ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1241-8.

84. Hreggvidsdottir HS, Noordenbos T, Baeten DL. Inflammatory pathways in spondyloarthritis. *Mol Immunol.* 2014;57(1):28-37.
85. van Duivenvoorde LM, Dorris ML, Satumtira N, van Tok MN, Redlich K, Tak PP, et al. Relationship between inflammation, bone destruction, and osteoproliferation in the HLA-B27/human $\beta 2$ -microglobulin-transgenic rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(10):3210-9.
86. Lories RJ, Haroon N. Bone formation in axial spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28(5):765-77.
87. de Vlam K. Soluble and tissue biomarkers in ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(5):671-82.
88. Przepiera-Będzak H, Fischer K, Brzosko M. Serum IL-6 and IL-23 Levels and Their Correlation with Angiogenic Cytokines and Disease Activity in Ankylosing Spondylitis, Psoriatic Arthritis, and SAPHO Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:785705.
89. Azevedo VF, Faria-Neto JR, Stinghen A, Lorencetti PG, Miller WP, Gonçalves BP, et al. IL-8 but not other biomarkers of endothelial damage is associated with disease activity in patients with ankylosing spondylitis without treatment with anti-TNF agents. *Rheumatol Int.* 2013;33(7):1779-83.
90. Gu X, Wu H, Fu P. Allicin attenuates inflammation and suppresses HLA-B27 protein expression in ankylosing spondylitis mice. *Biomed Res Int.* 2013;2013:171573.
91. Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(1):9-23.
92. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992;307(1):97-101.
93. Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6(2):109-18.
94. Evans HG, Roostalu U, Walter GJ, Gullick NJ, Frederiksen KS, Roberts CA, et al. TNF-alpha blockade induces IL-10 expression in human CD4+ T cells. *Nat Commun.* 2014;5:3199.

95. Lv C, Wang Y, Wang J, Zhang H, Xu H, Zhang D. Association of Interleukin-10 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med.* 2011;34(6):E370.
96. Wang NG, Wang DC, Tan BY, Wang F, Yuan ZN. TNF- α and IL10 polymorphisms interaction increases the risk of ankylosing spondylitis in Chinese Han population. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(11):15204-9.
97. Vazquez-Del Mercado M, Garcia-Gonzalez A, Muñoz-Valle JF, Garcia-Iglesias T, Martinez-Bonilla G, Bernard-Medina G, et al. Interleukin 1beta (IL-1beta), IL-10, tumor necrosis factor-alpha, and cellular proliferation index in peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2002;29(3):522-6.
98. Goedecke V, Crane AM, Jaakkola E, Kaluza W, Laiho K, Weeks DE, et al. Interleukin 10 polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Genes Immun.* 2003;4(1):74-6.
99. Machado P, Landewé R, Braun J, Hermann KG, Baker D, van der Heijde D. Both structural damage and inflammation of the spine contribute to impairment of spinal mobility in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(8):1465-70.
100. Falkenbach A, Herold M. In ankylosing spondylitis serum interleukin-6 correlates with the degree of mobility restriction, but not with short-term changes in the variables for mobility. *Rheumatol Int.* 1998;18(3):103-6.
101. Bal A, Unlu E, Bahar G, Aydog E, Eksioglu E, Yorgancioglu R. Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2007;26(2):211-5.

ANEXO A – BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) validado para o português

Índice BASDAI em escala de graduação numérica
(Adaptado com permissão do *J Rheumatol.*)

Nome _____

Data ____/____/____

BASDAI
Bath Ankylosing
Spondylitis Disease

Coloque uma marca na escala numérica abaixo, indicando sua resposta para cada questão relacionada à semana passada

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

Nenhum 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Intenso

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

Nenhum 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Intenso

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

Nenhum 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Intenso

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

Nenhum 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Intenso

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

Nenhum 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Intenso

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

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
0h 1h 2h mais

BASDAI: soma dos valores das questões 1,2,3,4 e a média dos valores da 5 e 6 dividindo este total por 5.

$$\text{BASDAI} = \frac{Q1 + Q2 + Q3 + Q4 + \left[\frac{Q5 + Q6}{2} \right]}{5}$$

Resultado final:

Pode-se também utilizar uma EVA de 0 a 100. A ASAS prefere utilizar escala de graduação numerada (EGN).

Referência: 1. J Sieper, M Rudwaleit, X Baraliakos, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(Suppl II):ii1-ii44. 2. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG et al. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994;21:2286-91. 3. Sampaio-Barros, PD, Azevedo VF, Bonfiglioli R, et al. Consenso Brasileiro de Espondilrotopatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica. Diagnóstico e Tratamento – Primeira Revisão. *Ver Bras Reumatol* 2007;47(4):233-242.

Valores de referência:

Escore \geq 4: doença ativa

Escore $<$ 4: doença inativa

ANEXO B – ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score)

- 1) Dor na coluna global (questão 2 do BASDAI)
- 2) Avaliação global do paciente*
- 3) Dor e edema em articulações periféricas (questão 3 do BASDAI)
- 4) Duração da rigidez matinal (questão 6 do BASDAI)
- 5) PCR em mg/dL

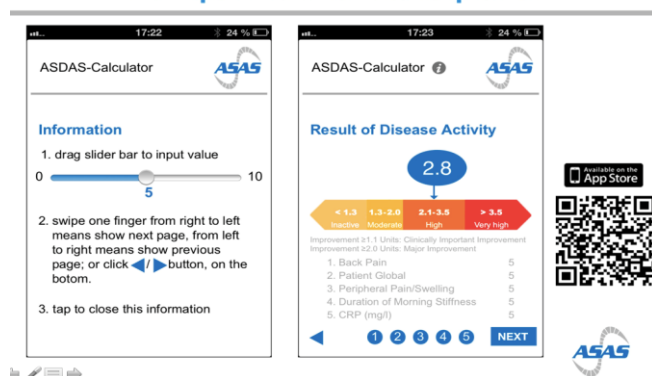
Cálculo do ASDAS

ASDAS_{PCR}

$$0.12 \times \text{dor na coluna global} + 0.06 \times \text{Duração da rigidez matinal} + 0.11 \times \text{Paciente Global} + 0.07 \times \text{dor/inflamação periférica} + 0.58 \times \text{Ln(PCR+1)}$$

Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=ASDAS>

Calculadora ASDAS: Um Aplicativo do Smartphone



Usado aplicativo de celular para cálculo do ASDAS PCR indicado pelo grupo ASAS. Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=ASDAS>

* **AVALIAÇÃO GLOBAL DO PACIENTE (AGP) : O quão ativa a sua doença estava na última semana?**

Sem atividade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Muito ativa

ANEXO C – BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index) validado para o português

Índice Funcional de Bath para Espondilite Anquilosante (BASFI)
(Adaptado com permissão do *J Rheumatol.*)

Nome _____ Data ____/____/____

Coloque uma marca na escala numérica abaixo de cada pergunta, indicando o seu grau de capacidade para realizar as seguintes atividades durante a última semana

1. Vestir meias ou meia-calça sem ajuda ou auxílio de aparelhos

fácil impossível

2. Curvar o corpo da cintura para cima para pegar uma caneta no chão sem o uso de um instrumento de auxílio

fácil impossível

3. Alcançar uma prateleira alta sem ajuda ou auxílio de um instrumento

fácil impossível

4. Levantar-se de uma cadeira sem braços da sala de jantar sem usar as mãos ou qualquer outro tipo de ajuda

fácil impossível

5. Levantar-se quando deitado de costas no chão sem ajuda.

fácil impossível

6. Ficar em pé sem ajuda por 10 minutos sem desconforto

fácil impossível

7. Subir 12 a 15 degraus sem usar o corrimão ou outra forma de apoio (andador); um pé em cada degrau

fácil impossível

8. Olhar para trás, virando a cabeça sobre o ombro sem virar o corpo

fácil impossível

9. Realizar atividades que exijam esforço físico, isto é, fisioterapia, jardinagem ou esporte

fácil impossível

10. Ter um dia repleto de atividades, seja em casa ou no trabalho

fácil impossível

BASFI: Média dos 10 itens avaliados na escala numérica.

Resultado final:

Pode-se também utilizar uma EVA de 0 a 100. A ASAS prefere utilizar escala de graduação numerada (EGN).

Referência: 1. J Stepp, M Rudwaleit, X Baraliakos, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;69(Suppl 1):i1-i44. 2. Calin A, Jones SD, Garratt SL, Kennedy LG. Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *Br J Rheumatol* 1995;34:793-4. 3. Sampaio-Barros, PD, Azevedo VF, Borghiglioli R, et al. Consenso Brasileiro de Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica. Diagnóstico e Tratamento – Primeira Edição. *Vir Bras Rheumatol* 2007; 4(1):233-242.

O somatório dos valores da escala numérica atribuídos a cada pergunta é dividido por 10 e dado o valor final. O escore varia de 0-10; quanto maior o valor, pior a capacidade funcional do indivíduo avaliado.

ANEXO D – ASQoL (Ankylosing Spondylitis Quality of Life) validado para o português

1. Minha doença limita os lugares que eu posso ir: Sim Não
2. Às vezes tenho vontade de chorar: Sim Não
3. Tenho dificuldade para me vestir: Sim Não
4. Tenho dificuldade para fazer os serviços da casa: Sim Não
5. É impossível dormir: Sim Não
6. Sou incapaz de participar de atividades com a família ou amigos: Sim Não
7. Estou cansado(a) o tempo todo: Sim Não
8. Tenho de ficar parando o que eu estou fazendo para descansar: Sim Não
9. Tenho dores insuportáveis: Sim Não
10. Demoro muito tempo para começar minhas coisas pela manhã: Sim Não
11. Sou incapaz de fazer os serviços de casa: Sim Não
12. Eu me canso facilmente: Sim Não
13. Eu me sinto frustrado frequentemente: Sim Não
14. A dor está sempre presente: Sim Não
15. Sinto que deixo de fazer muitas coisas: Sim Não
16. Acho difícil lavar meu cabelo: Sim Não
17. Minha doença me deixa deprimido: Sim Não
18. Eu me preocupo se deixo as pessoas desapontadas: Sim Não

Escores vão de 0 a 18. Cada item é pontuado como 0 ou 1. A pontuação 1 é recebida quando a resposta à pergunta feita é “sim”. As pontuações dos itens são somadas para fornecer um escore final. Quanto maior o escore, pior a qualidade de vida.

ANEXO E – BASMI 10 (Bath Ankylosing Spondylitis Metrologic Index)

Bath AS Metrology Index (BASMI) (Índice Metrológico de EA de Bath)

Coletando 5 medidas clínicas as quais refletem a mobilidade axial:

- ❶ Flexão lateral lombar,
- ❷ Distância trago-parede,
- ❸ Flexão lombar (Schober modificado),
- ❹ Distância intermaleolar máxima,
- ❺ Ângulo de rotação cervical.

Três definições diferentes foram publicadas:

- 1) definição a 2 passos (Jenkinson TR et al. J Rheumatol. 1994; 21: 1694-8)
- 2) definição a 10 passos (Jones SD et al. J Rheumatol 1995; 22: 1609)
- 3) definição linear (van der Heijde D et al. Ann Rheum Dis 2008; 67: 489-493)

ASAS recomenda a definição a 10 passos ou a definição linear do BASMI



Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=BASMI>

Neste estudo usamos o BASMI 10 para o cálculo do escore (definição a 10 passos).

BASMI 10 – Definição a 10 passos

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Flexão lateral	>20	18-20	15.9-17.9	13.8-15.8	11.7-13.7	9.6-11.6	7.5-9.5	5.4-7.4	3.3-5.3	1.2-3.2	<1.2
TP	<10	10-12.9	13-15.9	16-18.9	19-21.9	22-24.9	25-27.9	28-30.9	31-33.9	34-36.9	≥37
Schober modif.	>7.0	6.4-7.0	5.7-6.3	5.0-5.6	4.3-4.9	3.6-4.2	2.9-3.5	2.2-2.8	1.5-2.1	0.8-1.4	≤0.7
DIM	≥120	110-119.9	100-109.9	90-99.9	80-89.9	70-79.9	60-69.9	50-59.9	40-49.9	30-39.9	<30
Rotação cervical	>85	76.6-85	68.1-76.5	59.6-68	51.1-59.5	42.6-51	34.1-42.5	25.6-34	17.1-25.5	8.6-17	≤8.5

TP = trago-parede

DIM = distância intermaleolar máxima

A escala de BASMI é a média dos valores dos 5 componentes

ASAS recomenda a definição a 10 passos ou a definição linear

Jones SD et al. J Rheumatol 1995;22:1609 (com permissão)



Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=BASMI>

Para rotação cervical, distância trago-parede e flexão lateral lombar, usar a média das medidas da direita e da esquerda. Somar os escores obtidos para cada medida. Dividir este valor por 5 para obter o escore BASMI. O BASMI pode variar de 0-10. Quanto maior o valor, pior a mobilidade axial.

BASMI 10 – Manobras do exame físico

Mobilidade Axial - Schober Modificado



- Paciente em posição ereta
- Marca em uma linha imaginária que liga ambas espinhas ilíacas superiores posteriores (próximo às „cavinhas de Vênus“) (1)
- Uma outra marca é colocada 10 cm acima (2)
- O paciente se curva ao máximo para frente, medir a diferença entre as duas marcas (3)
- Anotar a diferença (em cm aproximando 0.1 cm)
- A melhor de duas tentativas é registrada.

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009; 68 (Suppl II) (com permissão)



Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=MOBILIDADE+AXIAL>

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009, 68 (Suppl II)

Mobilidade Axial - Flexão Axial Lateral



- Calcanhar e dorso apoiados à parede. Sem flexão dos joelhos, sem curvar-se para frente
- Posicionar uma marca na coxa (1), curvar-se lateralmente sem fletir joelhos ou elevar os calcanhares (2), e sem mover os ombros ou os quadris, fazer mais uma marca e registrar a diferença (3)
- A melhor de duas tentativas é anotada para a esquerda e para a direita separadamente.
- Finalmente, a média da esquerda e da direita é registrada (em cm aproximando para 0,1cm)

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009; 68 (Suppl II) (com permissão)



Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=MOBILIDADE+AXIAL>

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009, 68 (Suppl II)

Mobilidade Axial - Occipício-Parede (seta preta) e Trago-Parede (seta branca)



- Calcanhar e dorso apoiados à parede
- Queixo em posição habitual
- Máximo esforço para posicionar a cabeça (occipício) contra a parede
- Registrar a melhor de duas tentativas (em cm) para a distância occipício-parede e a média das distâncias trago-parede direita e esquerda

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009; 68 (Suppl II) (com permissão)



Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=MOBILIDADE+AXIAL>

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009, 68 (Suppl II)

Mobilidade Axial - Rotação Cervical



- O paciente senta-se ereto em uma cadeira, queixo em posição neutra, mãos sobre joelhos.
- O avaliador posiciona um goniômetro no topo da cabeça alinhando com a ponta do nariz (1)
- O avaliador pede para o paciente virar a cabeça ao máximo para a esquerda, seguindo com o goniômetro, e registra o ângulo entre o plano sagital e o novo plano após rotação (2)
- Uma segunda leitura é realizada e a melhor de duas é anotada para o lado esquerdo
- O procedimento é repetido para o lado direito.
- A média do lado esquerdo e do lado direito é registrada em graus (0-90 graus).

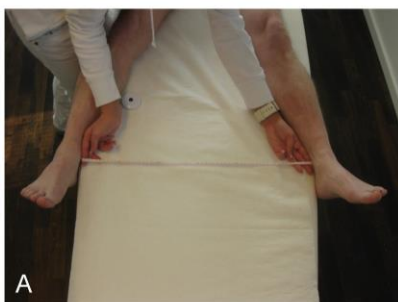
ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009; 68 (Suppl II) (com permissão)



Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=MOBILIDADE+AXIAL>

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009, 68 (Suppl II)

Distância Intermaleolar



- O paciente está deitado (A) com as pernas separadas o máximo possível com joelhos estendidos e artelhos apontando para cima (método preconizado).
- Alternativamente, o paciente permanece em pé (B) e afasta as pernas o máximo possível.
- A distância entre os maléolos mediais é medida.

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009; 68 (Suppl II) (com permissão)



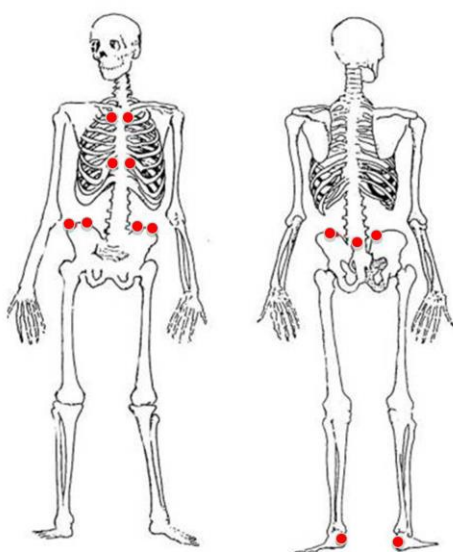
Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=MOBILIDADE+AXIAL>

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009, 68 (Suppl II)

ANEXO F – MASES (Maastricht Akylosing Spondylitis Enthesitis Score)

Durante o exame físico, aplica-se pressão sobre 13 pontos pré-determinados para pesquisa de dor. Estes pontos são sítios de inserção ligamentar no osso (enteses).

MASES: Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score (Contagem de Entesites em EA Maastricht)



- 13 sítios
- localização fácil
- sem graduação
- pontuação de 0 a 13

Condrocostal 1 direita/esquerda
 Condrocostal 7 direita/esquerda
 Espinha ilíaca ântero-superior direita/esquerda
 Crista ilíaca direita/esquerda
 Espinha ilíaca pósterio-superior
 direita/esquerda
 Processo espinhoso L5
 Inserção proximal do tendão de Aquiles
 direita/esquerda

Adaptado de Heuft et al. Ann Rheum Dis 2003;62:127-32 (com permissão)



Reproduzido do site do grupo ASAS, sessão de slides educacionais em: <http://slides.asas-group.org/app/slides/search?q=MASES>

ASAS handbook, Ann Rheum Dis 2009, 68 (Suppl II)

ANEXO G – 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?
Sim.
 2. **Introdução:** fundamentação, justificativa e relevância adequadas e pertinentes? Hipótese é apresentada?
Fundamentação adequada e hipótese apresentada.
 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 cálculo do tamanho amostral (28 pacientes em cada grupo).
 5. **Referências bibliográficas:** revisão da literatura, estudos prévios relevantes,...
Adequado.
 6. **Avaliação final**
 - a. Aprovado 24.06.13
 - b. Retornar com modificações para avaliação
 - c. Reprovado
- **Questões específicas** (em caso de retorno para modificações):
-

BPC
Barbara Evelyn Pinheiro da Costa
Coordenadora da Comissão Científica
FAMED - HSL - PUCRS

PUCRS

FACULDADE DE MEDICINA – HSL/PUCRS
Av. Ipiranga, 6690 – P. 6º – 3º andar – CEP 90610-000
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3304 – Fax (51) 3320-3040
E-mail: nucleom@puccrs.br
www.puccrs.br/medicina



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

Porto Alegre, 24 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 "PERFIL DO EIXO IL-23/CÉLULAS Th17 EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE".

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,

Prof^o Bartira E. Pinheiro da Costa
Coordenador da Comissão Científica
FAMED-HSL/PUCRS

Ilmo Sr

Prof Dr Henrique Staub
Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa

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: nuclem@puhrs.br
www.puhrs.br/medicina

ANEXO H – 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: Perfil do Eixo IL-23 / Células Th17 em Pacientes com Espondilite Anquilosante

Pesquisador: Henrique Luiz Staub

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35175413.9.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 834.121

Data da Relatoria: 31/10/2014

Apresentação do Projeto:

Ver conclusões.

Objetivo da Pesquisa:

Ver conclusões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver conclusões.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver conclusões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver conclusões.

Recomendações:

Ver conclusões.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram resolvidas de maneira satisfatória.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

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



Continuação do Parecer: 834.121

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 16 de Outubro de 2014

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

ANEXO I – Comprovante de Submissão de Artigo

REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA
BRAZILIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY

Contact us Help ?

Maintenance outage on 17 July 2016 ... [more](#)
'My EES Hub' available for consolidated users ... [more](#)

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: cristinarabelo@yahoo.com.br
Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#)

Version: EES 2016.5

Submissions Being Processed for Author Cristina Rabelo

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Serum IL-6 correlates to axial mobility index (BASMI) in Brazilian patients with ankylosing spondylitis	Jul 15, 2016	Jul 15, 2016	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

[<< Author Main Menu](#)

Brazilian Journal of Rheumatology

Para: Cristina Rabelo, crisfrabelo@gmail.com
Submission Confirmation

14 de julho de 2016 23:28
Caixa de Entrada - Yahoo!

Dear Dr. Cristina Rabelo,

We have received your article "Serum IL-6 correlates to axial mobility index (BASMI) in Brazilian patients with ankylosing spondylitis" for consideration for publication in Brazilian Journal of Rheumatology.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/bjr/>
2. Enter these login details:
Your username is: cristinarabelo@yahoo.com.br

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Brazilian Journal of Rheumatology

.....
Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:
http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

APÊNDICE A – Termo de Consentimento - Pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a):

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa clínica com o nome de **“PERFIL DO EIXO IL-23/CÉLULAS Th17 EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE”**.

O objetivo da pesquisa é avaliar como o seu sistema de defesa (sistema imunológico) está se comportando, com o objetivo de entender como sua doença se desenvolve. Vamos investigar se seu sangue contém níveis aumentados da célula de defesa Th17 e se isto influencia nos sintomas que você vem sentindo.

Serão examinados 28 pacientes do ambulatório de reumatologia do Hospital São Lucas da PUC portadores de espondilite anquilosante e além da história e exame físico, a coleta de sangue faz parte do protocolo de pesquisa. Pessoas saudáveis também doarão sangue para comparação com os achados encontrados nos pacientes.

A coleta de sangue pode gerar algum desconforto, assim como causar hematoma ou vermelhidão no local. Será realizada com agulha e seringa descartáveis e estéreis. O sangue será analisado para a presença de células de defesa e proteínas que causam inflamação (citocinas). Não serão realizadas outras análises sem o seu conhecimento e o material ficará armazenado em um freezer a uma temperatura de -80oC.

Vale salientar que você não terá nenhum custo durante a realização da pesquisa e também não receberá dinheiro pela sua participação. A participação na pesquisa é voluntária e o participante tem o direito de se retirar do estudo em qualquer momento. Asseguramos que sua identidade será mantida em absoluto sigilo durante e após a realização dessa pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre o estudo, dúvidas sobre seus direitos ou se você acredite que sofreu qualquer dano relacionado à pesquisa, você poderá entrar em contato com Cristina Rabelo ou Henrique Staub pelo celular (51) 9190 1003. Também pode contactar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS, telefone (51) 3320.3345.

Eu, _____ afirmo que tive tempo de ler, entender e esclarecer minhas dúvidas e concordo em participar voluntariamente da pesquisa acima descrita. Confirmando que recebi uma via original desde consentimento assinado para guardar. Outra cópia será arquivada pelo investigador.

Participante _____ Data ____/____/____

Pesquisador _____ Data ____/____/____

APÊNDICE B – Termo de Consentimento – Grupo Controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

Prezado (a) Senhor (a):

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa clínica com o nome de **“PERFIL DO EIXO IL-23/CÉLULAS Th17 EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE”**.

O objetivo da pesquisa é avaliar como o seu sistema de defesa (sistema imunológico) está se comportando, com o objetivo de comparar com pessoas que tem alterações neste sistema devido a uma doença. Vamos investigar se seu sangue contém níveis aumentados de proteínas inflamatórias chamadas de citocinas.

Você faz parte do grupo de pessoas saudáveis (os chamados controles), que são necessários em uma pesquisa clínica para servir de comparação com o grupo de pessoas doentes. O objetivo é comparar o seu sistema de defesa com o sistema de defesa de pessoas com uma doença chamada espondilite anquilosante, a fim de entender melhor a doença.

Acoleta de sangue pode gerar algum desconforto, assim como causar hematoma ou vermelhidão no local. Será realizada com agulha e seringa descartáveis e estéreis. O sangue será analisado para a presença de células de defesa e proteínas que causam inflamação (citocinas). Como você compareceu para doar sangue, serão feitas análises para infecções transmitidas pelo sangue conforme a rotina do Banco de Sangue. Não serão realizadas outras análises sem o seu conhecimento e o material ficará armazenado em um freezer a uma temperatura de -80oC.

Vale salientar que você não terá nenhum custo durante a realização da pesquisa e também não receberá dinheiro pela sua participação. A participação na pesquisa é voluntária e o participante tem o direito de se retirar do estudo em qualquer momento. Asseguramos que sua identidade será mantida em absoluto sigilo durante e após a realização dessa pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre o estudo, dúvidas sobre seus direitos ou se você acredite que sofreu qualquer dano relacionado à pesquisa, você poderá entrar em contato com Cristina Rabelo ou Henrique Staub no setor de reumatologia desde hospital, no telefone 3320.5057. Também pode contactar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS, telefone (51) 3320.3345.

Eu, _____ afirmo que tive tempo de ler, entender e esclarecer minhas dúvidas e concordo em participar voluntariamente da pesquisa acima descrita. Confirmando que recebi uma via original desde consentimento assinado para guardar. Outra cópia será arquivada pelo investigador.

Participante _____ Data ____/____/____

Pesquisador _____ Data ____/____/____

APÊNDICE C – Formulário de avaliação clínica**ESPONDILITE ANQUILOSANTE – EVOLUÇÃO**

Data: ___/___/___ Nome: _____
 Reg: _____ DN: _____ Estado Civil: _____ Sexo: _____
 etnia: _____
 Endereço: _____
 Telefone: _____
 Trabalhando: Sim () Não () Em casa ()
 Profissão: _____
 Incapacidade laboral: (0) Não (1) Parcial (2) Transitória (3) Total (Benefício INSS: Sim Não Já teve
 Exercício físico: Sim () Não () Horas por semana: _____
 HAS () DM () Obsidade () Tabagismo () (maços-ano:) Etilismo () (quantidade:)
 Tuberculose () (profilaxia: tto:) Eventos CV () (tipo:)

Medicamento	Posologia	Medicamento	Posologia
Analgésicos			
AINES			
Prednisona			
Metotrexato			
Leflunomida			
Sulfassalazina			
Anti-TNF			

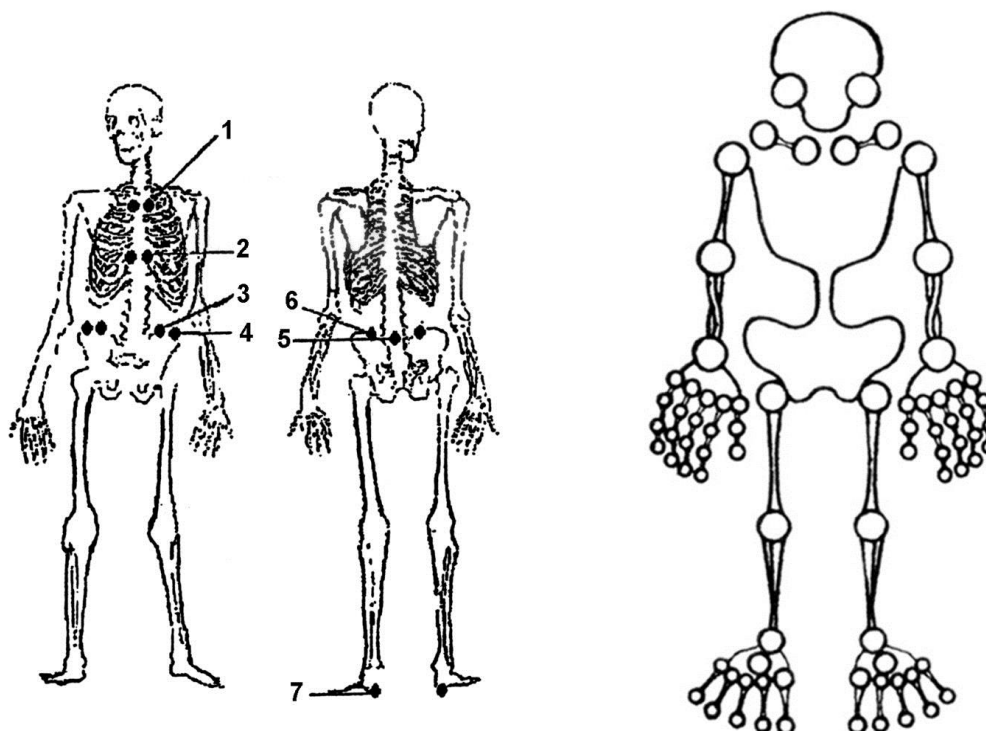
EVOLUÇÃO: _____

EXAME FÍSICO: PA: ___X___ Peso: _____ Altura: ___ _____

Mobilidade da coluna	Dor ou limitação funcional
Expansão torácica: _____cm	Ombros: () não () D () E
Schober: _____cm	Coxofemoral: () não () D () E
Dist. dedo-solo: _____cm	Sacroilíaca: () não () D () E
Dist. trago-parede: _____cm	

Lateral-lombar: D: _____ cm E: _____ cm	
Dist. intermaleolar: _____ cm	
Rot. cervical: () >70° () 20-70° () < 20° valor exato da medida:	

VHS: _____ PCR: _____ HLA-B27: _____



Enteses

1- 1º costochondral

5- Processo espinhoso L

2- 7º costochondral

6- Espinha ilíaca post-sup

Dolorosas: _____

3- Crista ilíaca

7- Inserção tendão de aquiles

4- Crista ilíaca ântero-superior

BASDAI: _____ ASDAS: _____ BASFI: _____

APÊNDICE D –Artigo Submetido

Brazilian Journal of Rheumatology

Editorial Office

To the Editors

We would like to submit the enclosed paper entitled "*Serum IL-6 correlates to axial mobility index (BASMI) in Brazilian patients with ankylosing spondylitis*" for publication as brief communication in your Journal.

We are aware that only three tables or figures are allowed for this kind of article. We have three tables and one figure, and we apologize for that in advance. We realize that the inclusion of figure is really important in our results. We wonder if the article can be peer reviewed even so.

The current paper has not been published or submitted to publication in other journals. All authors contributed significantly to the paper and are in full agreement with the content of the manuscript.

Yours sincerely

Cristina Rabelo.

Rheumatologist Department,

Sain Lucas Hospital of PUCRS.

Av.Ipiranga 6690, room 220.

90610-000, Porto Alegre-RS, Brazil.

E.mail: reumatoacademico@gmail.com

Porto Alegre, July 3rd, 2016.

Serum IL-6 correlates to axial mobility index (BASMI) in Brazilian patients with ankylosing spondylitis.

Cristina Rabelo¹, Talita Siara Almeida Baptista², Laura Esteves Petersen², Moisés Evandro Bauer², Mauro Waldemar Keiserman¹, Henrique Luiz Staub¹.

¹Rheumatology Department, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre-RS, Brazil.

²Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research, PUCRS, Porto Alegre-RS, Brazil.

Address for correspondence:

Cristina Rabelo.

Rheumatologist Department, Sain Lucas Hospital of PUCRS.

Av.Ipiranga 6690, room 220. 90610-000, Porto Alegre-RS, Brazil.

E.mail: reumatoacademico@gmail.com

Study supported by research funds of Rio Grande do Sul Rheumatology Society

The authors have no conflicts of interest

Abstract

Introduction. Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic disease featuring axial changes, peripheral arthritis and systemic involvement. Proinflammatory cytokines are probably involved in AS pathogenesis. The relationship of circulating cytokines with instruments of AS evaluation is an open field. We herein compared serum levels of cytokines in AS patients and healthy controls, and searched for correlations of cytokines with indexes of disease activity and quality of life. **Methods.** In this cross-sectional study, 32 AS patients and 32 age-and-sex matched controls were evaluated. BASDAI, BASFI, BASMI, ASDAS-CRP, MASES, ASQol and PGA were measured in AS patients. The soluble cytokines IL-6, IL-8, IL-1, IL-10, TNF- α , IL-12p70 and IL-17 were quantified by flow cytometry. IL-23 concentrations were obtained in an ELISA. **Results.** Overall, AS patients were predominantly males (59.4%) and Caucasians (96.9%). Mean age was 46.9 \pm 10.7 years. HLA B27 was present in 70% of cases. Concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α were higher in AS cases than controls. Mean concentration of IL-6 correlated with the BASMI, an index of axial mobility ($r_s = 0.354$, $p = 0.047$). Anti-TNF intake (present in 21 patients, 65.6%) associated with a high BASMI ($p = 0.042$) and lower quality of life as measured by the ASQol ($p = 0.009$). **Conclusions.** A proinflammatory cytokine profile predominated in AS patients, but interestingly the IL-10 concentrations were also elevated, pointing to an attempt of a suppressive control of inflammation. A defined correlation of serum IL-6 with the BASMI suggests a role for this cytokine in axial disease. Anti-TNF users had more axial activity and lower quality of life.

Key words: ankylosing spondylitis; cytokines; disease activity index; quality of life score.

Introduction

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic, polygenic inflammatory disorder featuring sacroiliitis and damage of axial skeleton. Peripheral arthritis, enthesopathy, and anterior uveitis are common. AS is strongly associated to the human leukocyte antigen B27 (HLA-B27), but the pathogenic role of HLA-B27 in AS is yet nebulous (1).

Proinflammatory cytokines are probably involved in initiation and perpetuation of disease. Recent genome-wide association studies suggested that specific cytokine pathways are possibly involved in AS pathogenesis (2).

The linkage of cytokine profiles with instruments of clinical evaluation in AS has been an issue of recent interest. We herein set out to compare concentrations of pro and antiinflammatory cytokines in AS patients and healthy controls. We then searched for specific association of cytokines with instruments of clinical appraisal, including indexes of disease activity and quality of life.

Patients and methods

In this cross-sectional study, consecutive patients with AS were recruited from our outpatient clinic. Patients above 18 years of age were classified as having AS according to the modified New York (3) and/or ASAS criteria for axial disease (4). Only patients with symmetrical sacroiliitis were included. Subjects with psoriasis, inflammatory bowel disease, reactive arthritis, cancer and acute infectious disease were excluded. Healthy controls matched for age and sex were recruited from our serum bank. Patients and controls signed a free consent. The study was approved by the local ethical committee.

The following clinical instruments were utilized to evaluate AS patients: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (5); Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) (6); Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI), where five clinical measures evaluate the status of axial skeleton: cervical rotation, tragus to wall distance, lumbar side flexion, lumbar flexion, and intermalleolar distance (7); Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-C reactive protein (ASDAS-CRP) (8); Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score (MASES) (9); Ankylosing Spondylitis Quality of Life (ASQoL) (10); Patient Global Assessment score (PGA), taken from the ASDAS.

The soluble cytokines IL-6, IL-8, IL-1, IL-10, TNF- α , IL-12p70 and IL-17 were simultaneously measured by flow cytometry using the cytometric bead array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences). The IL-23 concentration was evaluated in an ELISA (Life Technologies). Results were expressed in pg/mL. CRP levels were searched by dry chemistry method (abnormal above 1 mg/dL).

Statistical analyses were performed using SPSS for Windows, version 20.0.. Categorical variables were described as numbers and percentage. Variables with a normal distribution were presented as mean \pm standard deviation (SD), and the between-group comparisons were performed using Student's *t* test. Non-normal quantitative or ordinal variables were presented as the median and interquartile range (IQR, representing the values of the 25th and 75th percentiles), and the between-group comparisons were performed using the Mann-Whitney or Kruskal-wallis tests. Correlation was assessed using the Spearman or Pearson test. Two-tailed *p* values equal or less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Thirty-two patients and controls comprised our sample, being the mean age of 46.9 ± 10.7 years in cases and 46.5 ± 9.7 in controls. Males predominated in cases and controls (19 individuals in each group, 59.4%). A predominance of Caucasians was seen in AS (31 patients, 96.9%). The median of disease duration was high (18 years).

Among the 32 AS patients, 30 fulfilled criteria according to the modified New York criteria, while the remaining two fulfilled criteria of non-radiographic axial spondylitis (nr-axial SpA) by the ASAS. Enthesitis was documented in 27 patients (84.5%), while peripheral arthritis was seen in about 9% of our patients. Positivity for HLA-B27 was detected in two third of AS patients.

Regarding the BASDAI index, elevated values were seen in half of the patients. The medians of BASFI and BASMI were compatible with low to moderate disease activity. In turn, an abnormal ASDAS-CRP was seen in all patients. For a maximum score of 13, the median of MASES (4.5) was compatible with a high frequency of enthesitis. The medians of ASQol and PGA revealed a moderate quality of life.

Table 1. Clinical characteristics of the 32 patients with AS.

Variable	Value
Age (mean \pm standard deviation)	46.9 \pm 10.7
Males	19 (59.4%)
White race	31 (96.9%)
Median of disease duration (P25-P75)	18 (10-31)
Axial spondylitis	
Modified New York criteria	30 (93.7%)
ASAS criteria	2 (6.3%)
Enthesitis	27 (84.5%)
Peripheral arthritis	3 (9.4%)
HLA-B27 positivity	17/24 (70.8%)
BASDAI (median, P25-P75)	3.9 (2.1-6.3)
BASDAI elevated (≥ 4)	16 (50%)
BASFI (median, P25-P75)	4 (1.3 – 6,0)

BASMI (median, P25–P75)	3.4 (2.3 – 4.2)
ASDAS-CRP – (median, P25–P75)	2.9 (2.3 – 3,5)
ASDAS-CRP	
Inactive disease (<1.3)	0/30 (0%)
Moderate activity (1.3-2.1)	6/30 (20%)
High activity (2.1-3.4)	15/30 (50%)
Very high activity (≥3.5)	9/30 (30%)
MASES (median of painful points, P25–P75)	4.5 (1-6)
ASQol (median, P25–P75)	8 (5.3 – 10.8)
PGA (median, P25–P75)	44.5 (21.3 – 60)

P25-P75: percentile 25 to 75.

BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (scale 0-10);

BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Funcional Index (scale 0-10);

BASMI: Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (scale 0-10);

ASDAS-CRP: Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-C reactive protein (scale 0-10);

MASES: Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score (13 standardized points, range 0-13);

ASQol: Ankylosing Spondylitis Quality of Life (scale 0-18)

PGA: Patient Global Assessment (scale 0-100 mm).

Regarding to drug intake, 21 patients (65.6%) were using an anti-TNF- α agent, with a median of 3 (2-5) years of use. Twelve patients (37.5%) were on nonsteroid antiinflammatory drugs and 9 (28.1%) were on prednisone. Ten patients (31.3%) were using methotrexate and 4 (12.5%) patients were on sulfasalazine.

The cytokine concentrations of AS patients and controls are seen in table 2. The IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-8 concentrations were significantly higher in individuals with AS.

Table 2. Cytokine concentrations (pg/mL) in cases and controls.

Cytokine	Patients (n=32)	Controls (n=32)	p
IL-12p70*	3.14 (1.88 – 4.89)	4.33 (3.90 – 5.38)	0.071#
IL-6**	4.80 \pm 1.40	3.78 \pm 0.88	0.003##
IL-10**	2.58 \pm 0.85	2.13 \pm 0.53	0.032##
TNF- α *	5.01 (3.68 – 7.77)	3.23 (2.67 – 3.57)	<0.001#
IL-1**	59.6 \pm 18.4	60.3 \pm 12.8	0.882##
IL-8*	6.33 (5.46 – 8.14)	4.77 (4.34 – 5.73)	<0.001#
IL-23**	267 \pm 81.2	242 \pm 99.5	0.252##
IL-17**	6.20 \pm 0.88	6.23 \pm 0.71	0.902##

n:sample number; *median; **mean plus standard deviation; #Wilcoxon test; ##Student-t test for matched samples.

The correlations of cytokine concentrations with the several instruments of clinical evaluation can be seen in table 3. There was a significant correlation of mean IL-6 concentration with the BASMI. No other correlations were observed. Table 3. Correlations of cytokine levels with instruments of clinical evaluation using the Spearman coefficient.

Cytokines	BASDAI	BASFI	BASMI	ASDAS PCR	MASES	AsQol	PGA
IL-12	0.057	0.045	0.167	0.268	-0.051	-0.006	-0.266
IL-6	-0.070	0.286	0.354*	0.099	-0.097	0.229	0.012
IL-10	-0.072	-0.043	-0.109	-0.086	-0.012	0.052	-0.200
TNF- α	0.085	0.133	0.161	0.114	-0.048	-0.040	0.129
IL-1	0.081	0.076	0.101	0.188	0.081	0.223	0.142
IL-8	-0.087	0.075	0.159	0.046	0.052	0.319	-0.008
IL-23	0.042	0.172	0.146	-0.101	0.229	0.271	-0.138
IL-17	-0.057	-0.350	-0.080	-0.030	-0.210	-0.177	-0.165

*p=0.047. Other correlations p>0.05.

BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index

BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Funcional Index

BASMI: Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index

ASDAS-CRP: Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-C reactive protein

MASES: Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score

ASQol: Ankylosing Spondylitis Quality of Life

PGA: Patient Global Assessment

Figure 1 illustrates the correlation of IL-6 concentrations with the BASMI, showing that the higher the cytokine level, the higher was the BASMI.

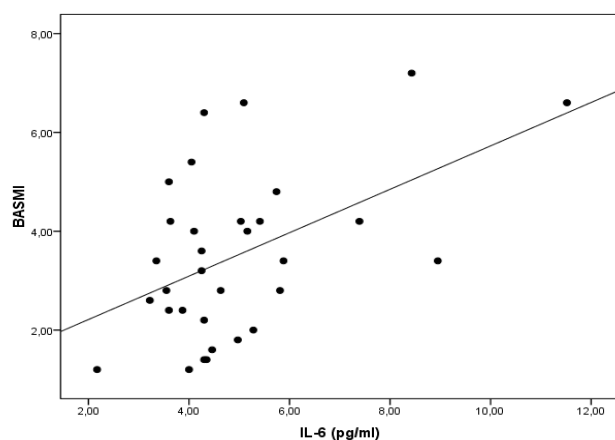


Figure 1. Correlation of IL-6 concentrations with the BASMI (rs=0.354, p=0.047, Spearman test).

We searched for associations of anti-TNF- α agent intake (present in 21 patients, absent in 11 patients) and cytokine concentrations. There was no association of anti-TNF- α intake with median or mean concentrations of any cytokine ($p > 0.05$, Mann-Whitney or Student-t test adjusted for disease duration, BASMI, BASFI and ASQol by analysis of covariance).

We also looked for associations of anti-TNF- α intake with instruments of clinical evaluation. Anti-TNF- α intake was associated to an elevated BASMI ($p = 0.042$, Mann-Whitney test) and low quality of life as measured by the ASQoL (0.009, Mann-Whitney test).

Discussion

We herein compared cytokine concentrations of AS patients and controls, and correlated the cytokine profile with scores of disease activity and quality of life. For comparison of cytokine concentrations, age-and-sex matched controls were utilized.

Out of the 32 AS patients, two were classified as having nr-axial SpA according to the ASAS criteria. Of note, both had symmetrical sacroiliitis. We decided to include these 2 patients considering a modern concept in which a nr-axial SpA represents an early stage or an abortive form of AS. No differences in clinical presentation, assessment of disease activity and response to anti-TNF- α agents were noticed between groups, according to recent data (11).

Overall, our AS patients were predominantly middle-aged males, Caucasians, with long duration of disease. The predominance of Caucasians was in accordance to European studies (12). Only 3 of our patients (9.4%) showed peripheral arthritis, while enthesitis very frequent (84.4%). A lower prevalence of enthesitis was seen in Latins (54%) and Europeans (38%) as compared to ours (13). The frequency of HLA B27 in the current study (70%) was similar to a previously described in Brazilian patients with AS (14).

The median of BASDAI and BASFI in our patients were compatible with moderated disease activity despite treatment. A former Brazilian study reported similar grades of disease activity (15). The current report originally evaluated BASMI, ASDAS-CRP and ASQol in a Brazilian survey of AS. While the BASDAI was elevated in 50% of cases, the ASDAS-CRP index was by far the most sensitive index, being altered in all cases. The ASQol and PGA data revealed not more than moderate

quality of life. Due to the high frequency of active disease, low quality of life and also the drug availability in the health system, the majority of patients AS (two third) were being treated with anti-TNF- α agents.

In comparison to controls, our AS patients showed significantly high concentrations of most of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8, TNF- α), but also of IL-10, a suppressive cytokine.

Elevated IL-6 levels were previously depicted in AS, with a positive association with CRP, platelet count and clinic parameters (16). Likewise, high levels of IL-8 have been described in AS patients (17), and another study associated IL-8 levels with the BASDAI and ASDAS (18), a finding not confirmed herein. Similarly to our results, TNF- α levels were found to be high in AS patients, with no clear association with clinic indexes (19).

Concentrations of IL-1, IL-12, IL-23 and IL-17 did not differ in AS patients and controls. Differently, IL-12, IL-23 and IL-17, as well as IL-6, were all elevated in AS patients, according to a 2012 study. In the same report, an interesting correlation of IL-23 with the BASMI was found (20).

Of interest, levels of IL-10, an antiinflammatory cytokine, were also high in our patients with AS. This hyperexpression of IL-10 might represent a suppressive response directed to inflammation. In 2011, increased serum levels of IL-10 were reported in Chinese patients with AS (21). As opposed, IL-10 levels did not differ in AS patients and controls in a Mexican study (22). As seen, data regarding the role of IL-10 in AS are conflicting.

Concerning the correlations of cytokines with instruments of clinical evaluation, our only significant data was the link of IL-6 levels with the BASMI. This is an intriguing finding, once BASMI selectively evaluates axial function. Yet in 1997, Falkenbach & Herold had demonstrated a relationship of IL6 with three out of five non-standardized tests of axial mobility (23).

Irrespective of high IL-6 levels in our AS patients, we found no association of this cytokine with composite scores (BASDAI, BASFI, ASDAS, MASES) and quality of life scores. The study of Bal et al accounted for high IL-6 in AS patients, but differed from ours by not showing correlation with the BASMI (24).

As seen, only two previous studies searched for correlation of cytokines with the BASMI (20,24). Our study is probably the first correlating IL-6 with such a

recognized index of axial mobility. If IL-6 is working as a biomarker of axial disease, this is a hypothesis to be further addressed. If confirmed, the impact in AS therapeutics would be a field to be explored. Nevertheless, a recent metanalysis pointed to lower efficacy of tocilizumab, a blocker of IL-6 receptor, in comparison to infliximab and secukinumab in AS patients (25).

Approximately two third of our AS patients were on anti-TNF- α therapy. Methotrexate was frequently employed as an adjuvant of anti-TNF- α drugs to avoid the production of anti-drug antibodies, and also for treating peripheral arthritis. Of note, anti-TNF- α users showed high BASMI, meaning reduced axial mobility, and low quality of life. As our patients had long-lasting disease, spinal deformities and hip involvement may have played an important role in this context.

Of interest, no association of anti-TNF- α intake with the serum cytokine profile (TNF- α included) was obtained. In another words, measurement of cytokines was not helpful to discriminate users and non-users of anti-TNF- α agents.

Our study has limitations to be cited, mostly the cross-sectional design (not allowing cause-effect statements), and the low casuistic. The main reason for the low sample was our decision to include only patients with classical AS. Such focus in AS allowed us a more selective interpretation of results, however.

In summary, we here demonstrated that proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8, TNF- α) were upregulated in AS patients. The high IL-10 levels probably represented a suppressive feedback pathway. An intriguing and defined correlation of serum IL-6 with the BASMI was documented, suggesting a role for this cytokine in axial damage. Lastly, we have shown that anti-TNF- α users had more axial activity and lower quality of life. Further research may clarify the connection of cytokines with instruments of clinical evaluation in AS.

References

1. Dakwar E, Reddy J, Vale FL, Uribe JS; A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Neurosurg Focus*. 2008;24(1):E2.
2. Smith JA. Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(1):489.
3. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A: Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 27:361-8, 1984.

4. Auleley GR, Dougados M, Baron G. Sample sizes estimated in clinical trials using either a composite index (ASAS response criteria) or single outcome variables in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(6):1693-4.
5. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A: A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 21:2286-91, 1994.
6. Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O'Hea J, Mallorie P, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol* 1994;21:2281-5.
7. Jenkinson TR, Mallorie PA, Whitelock HC, Kennedy LG, Garrett SL, Calin A. Defining spinal mobility in ankylosing spondylitis (AS): The Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Score. *J Rheumatol* 1994;21:1694 - 8.
8. Nukas C, Landewé R, Sieper J, Dougados M, Davis J, Braun J, van der Linden S, van der Heijde D. Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:18-24.
9. Heuft-Dorenbosch L, Spoorenberg A, van Tubergen A, Landewé R, van der Tempel H, Dougados M et al. Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:127-132
10. Doward LC, Spoorenberg A, Cook SA, Whalley D, Helliwell PS, Kay LJ, et al. Development of the ASQol: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:20-6.
11. Baraliakos X, Braun J. Non-radiographic axial spondyloarthritis and ankylosing spondylitis: what are the similarities and differences? *RMD Open.* 2015;1(Suppl 1):e000053.
12. Stolwijk C, Boonen A, van Tubergen A, Reveille JD. Epidemiology of spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012;38(3):441-76.
13. Benegas M, Muñoz-Gomariz E, Font P, Burgos-Vargas R, Chaves J, Palleiro D, et al. Comparison of the clinical expression of patients with ankylosing spondylitis from Europe and Latin America. *J Rheumatol.* 2012;39(12):2315-20.
14. Sampaio-Barros PD. Epidemiology of spondyloarthritis in Brazil. *Am J Med Sci.* 2011;341(4):287-8.
15. Gallinaro AL, Ventura C, Sampaio Barros PD, Goncalves CR. Spondyloarthritis: analysis of a Brazilian series compared with a large Ibero-American registry (RESPONDIA group). *Rev Bras Reumatol.* 2010;50(5):581-9.
16. Gratacós J, Collado A, Filella X, Sanmartí R, Cañete J, Llena J, et al. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol.* 1994;33(10):927-31.
17. Azuz-Lieberman N, Markel G, Mizrahi S, Gazit R, Hanna J, Achdout H, et al. The involvement of NK cells in ankylosing spondylitis. *Int Immunol.* 2005;17(7):837-45.

18. Azevedo VF, Faria-Neto JR, Stingen A, Lorencetti PG, Miller WP, Gonçalves BP, et al. IL-8 but not other biomarkers of endothelial damage is associated with disease activity in patients with ankylosing spondylitis without treatment with anti-TNF agents. *Rheumatol Int.* 2013;33(7):1779-83
19. Wang J, Zhao Q, Wang G, Yang C, Xu Y, Li Y, et al. Circulating levels of Th1 and Th2 chemokines in patients with ankylosing spondylitis.
20. Taylan A, Sari I, Kozaci DL, Yuksel A, Bilge S, Yildiz Y, et al. Evaluation of the T helper 17 axis in ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2012;32(8):2511-5.
21. Lv C, Wang Y, Wang J, Zhang H, Xu H, Zhang D. Association of Interleukin-10 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med.* 2011;34(6):E370.
22. Vazquez-Del Mercado M, Garcia-Gonzalez A, Muñoz-Valle JF, Garcia-Iglesias T, Martinez-Bonilla G, Bernard-Medina G, Sanchez-Ortiz A, et al. Interleukin 1beta (IL-1beta), IL-10, tumor necrosis factor-alpha, and cellular proliferation index in peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med.* 2011;34(6):E370.
23. Falkenbach A, Herold M. In ankylosing spondylitis serum interleukin-6 correlates with the degree of mobility restriction, but not with short-term changes in the variables for mobility. *Rheumatol Int.* 1998;18(3):103-6.
24. Bal A, Unlu E, Bahar G, Aydog E, Eksioglu E, Yorgancioglu R. Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2007;26(2):211-5.
25. Chen C, Zhang X, Xiao L, Zhang X, Ma X. Comparative Effectiveness of Biologic Therapy Regimens for Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review and a Network Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(11):e3060.