

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALBUMINA  
MODIFICADA PELA ISQUEMIA, UM NOVO  
BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO, EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Michele Rodrigues Leitemperguer**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALBUMINA MODIFICADA PELA  
ISQUEMIA, UM NOVO BIOMARCADOR DE ESTRESSE  
OXIDATIVO, EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

**por**

**Michele Rodrigues Leitemperguer**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALBUMINA MODIFICADA PELA  
ISQUEMIA, UM NOVO BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO,  
EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

elaborada por  
**Michele Rodrigues Leitemperguer**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**José Edson Paz da Silva, Dr.**  
(presidente/orientador)

**Adriana Dornelles Carpes, Dra. (UNIFRA)**

**Sandra Trevisan Beck, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 15 de janeiro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela realização deste sonho, pela força e coragem para enfrentar as dificuldades que apareceram durante o caminho.

A minha mãe, irmãos e cunhadas pelo carinho, compreensão e força que sempre dedicaram a mim. Obrigada a minha querida mãe pelo incentivo e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida. Amo todos vocês.

Ao meu namorado Fernando, que esteve sempre ao meu lado durante essa trajetória, muito obrigada pelo carinho, pela força, pelas palavras de incentivo e motivação nos momentos difíceis. Te amo muito.

As minhas queridas amigas Priscila, Cristiane e Luciane, relíquias encontrada durante este caminho, obrigada pela amizade e carinho.

A colega Aline, obrigada pela amizade, apoio e paciência, obrigada por estar sempre disposta a ajudar.

Ao pessoal do setor de coleta do LAC, em especial ao Guilherme, Vera, Ione e Luci, obrigada pela dedicação, por serem sempre prestativos e sempre prontos para ajudar.

Ao setor de hematologia e bioquímica do LAC, em especial a Rejane e Gika, pela paciência, dedicação e por disporem do seu tempo para me ajudar.

Ao professor Rafael Moresco e todos os colegas do laboratório de Bioquímica, em especial a Etiane, Helena, Guilherme e Zé, muito obrigada pelo auxílio, apoio e dedicação na realização desse trabalho.

As professoras Sandra Trevisan Beck e Adriana Dornelles Carpes, por aceitarem o convite para comporem a banca examinadora dessa dissertação.

As pessoas que voluntariamente participaram desta pesquisa, obrigada pela contribuição neste trabalho.

A UFSM e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar este curso.

A CAPES, pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador professor José Edson, muito obrigada pelo incentivo e pela oportunidade na realização deste curso.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALBUMINA MODIFICADA PELA ISQUEMIA, UM NOVO BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO, EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

AUTORA: MICHELE RODRIGUES LEITEMPERGUER

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Data e local da defesa: Santa Maria, 15 de janeiro de 2013.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, de caráter autoimune, caracterizada por poliartrite periférica e simétrica, que leva à deformidade e destruição das articulações devido à erosão da cartilagem e do osso. Esta é uma doença comum que afeta aproximadamente 1% da população mundial, sendo mais frequente em mulheres do que nos homens, no entanto, seu pico de incidência ocorre entre a quarta e sexta décadas de vida. Grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram identificadas no fluido sinovial de pacientes com AR, e essa grande quantidade pode levar a dano oxidativo ao ácido hialurônico, lipídios, matriz da cartilagem e ao DNA. O acúmulo de EROs nas células, também serve como importantes moléculas sinalizadoras intracelulares que amplificam a resposta inflamatória - proliferativa sinovial. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de albumina modificada pela isquemia (IMA) e outros marcadores de estresse oxidativo e inflamação em 16 pacientes com AR e 20 controles saudáveis. Os níveis de IMA foram significativamente maiores no grupo de pacientes com AR do que os controles saudáveis ( $0.495 \pm 0.01$  vs  $0.433 \pm 0.02$  ABSU,  $P=0.038$ ). Não foram observadas diferenças significativas para os outros marcadores estudados. Desta forma, foi possível concluir que além da AR estar relacionada com a inflamação, os níveis elevados de IMA em pacientes com AR, sugerem que esta patologia promova o aumento do estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** artrite reumatoide. espécies reativas de oxigênio. albumina modificada pela isquemia. proteína C-reativa. produtos proteicos de oxidação avançada.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ASSESSMENT OF ISCHEMIA- MODIFIED ALBUMIN LEVELS, A NOVEL OXIDATIVE STRESS BIOMARKER, IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**

AUTHOR: MICHELE RODRIGUES LEITEMPERGUER  
ADVISOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA  
Date and Place: Santa Maria, 15 de janeiro de 2013.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory, autoimmune disease, characterized by peripheral and symmetrical polyarthritis that leads to joint destruction and deformity due to erosion of cartilage and bone. This is a common disease that affects approximately 1% of the world population and is more common in women than men, however, its peak incidence occurs between the fourth and sixth decades of life. Large amounts of reactive oxygen species (ROS) have been identified in the synovial fluid of RA patients, and such large amounts may lead to oxidative damage of hyaluronic acid, lipid, cartilage matrix and DNA. The accumulation of ROS in the cells, also serves as major intracellular signaling molecules that amplify the inflammatory response synovium proliferative. The objective of this study was to evaluate the levels of ischemia-modified albumin (IMA) and also other markers of oxidative stress and inflammation in 16 patients with RA and 20 healthy controls. IMA levels were significantly higher in RA patients than healthy controls ( $0.495 \pm 0.01$  vs  $0.433 \pm 0.02$  ABSU,  $P=0.038$ ). No significant differences were observed for the other markers studied. Thus it was concluded that besides RA being related to inflammation, elevated levels of IMA in RA patients suggest that this pathology promotes increased oxidative stress.

**Keywords:** rheumatoid arthritis. reactive oxygen species. ischemia-modified albumin. C-reactive protein. advanced oxidation protein products.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Artrite reumatoide  
AGES: produtos finais de glicação avançada  
ACB: *albumin cobalt binding*  
ACR: *American College of Rheumatology*  
ACRSRA: *American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines*  
AINH: anti-inflamatórios não hormonais  
Anti-CCP: anticorpos contra peptídeos cíclicos citrulinados  
Anti-TNF: bloqueadores do fator de necrose tumoral  
AOPP: Produtos Proteicos da Oxidação Avançada  
CAT: catalase  
CV: cardiovascular  
DMCD: drogas modificadoras do curso da doença  
DNA: Ácido Desoxirribonucléico  
EULAR: *European League Against Rheumatism*  
ERNs: espécies reativas de nitrogênio  
EROs: espécies reativas de oxigênio  
FR: fator reumatoide  
GPx: glutationa peroxidase  
GR: glutationa redutase  
HAS: hipertensão arterial sistêmica  
Hct: hematócrito  
Hg: hemoglobina  
HLA: antígeno leucocitário humano  
IgG: imunoglobulina G  
IFP: interfalangeanas proximais  
IL-1: interleucina -1  
IL-6: interleucina- 6  
IL-8: interleucina-8  
IMA: albumina modificada pela isquemia  
MCF: metacarpofalangeanas  
MPO: mieloperoxidase  
MTF: metatarsofalangeanas  
MTX: metotrexato  
NFkB: fator nuclear kappa-B  
PCR: proteína C-reativa  
SOD: superóxido dismutase  
TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$   
VCM: volume corpuscular médio  
VHS: velocidade de hemossedimentação

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	52
APÊNDICE B – Questionário .....	54
APÊNDICE C – Termo de Confidencialidade.....	55



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática dos eventos que ocorrem na artrite reumatoide.....	15
Figura 2 – Comparação entre articulação normal e com AR.....	16
Figura 3 – Critérios de classificação para AR 2010 ACR/EULAR .....	18
Figura 4 – Ligação do cobalto a região N-terminal da albumina normal .....	23
Figura 5 – Teste de ligação da albumina ao cobalto .....	24

## ARTIGO

Figura 1 – Concentrations of IMA observed in study population. *P<0.05 compared to normal subjects.....	40
---	----

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Critérios de classificação da Artrite Reumatoide .....	17
Tabela 2 – Achados laboratoriais associados a AR .....	20

## **ARTIGO**

Tabela 1 – Characteristics of study patients.....	40
---	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
<b>2.1 Artrite Reumatoide</b> .....	13
2.1.1 Definição e epidemiologia .....	13
2.1.2 Manifestações clínicas .....	13
2.1.3 Fisiopatologia .....	14
2.1.4 Diagnóstico .....	16
2.1.5 Tratamento .....	20
<b>2.2 Estresse oxidativo e Artrite reumatoide</b> .....	21
<b>2.3 Proteína C-reativa e artrite reumatoide</b> .....	26
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	28
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	28
<b>4. ARTIGO</b> .....	29
<b>SHORT COMMUNICATION</b> .....	29
<b>Assessment of ischemia-modified albumin levels in patients with rheumatoid arthritis</b> .....	29
<b>SUMMARY</b> .....	30
<b>INTRODUCTION</b> .....	30
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	32
<b>RESULTS</b> .....	33
<b>DISCUSSION</b> .....	33
<b>REFERENCES</b> .....	36
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43
<b>APÊNDICES</b> .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica, autoimune, que tem como principal característica a presença de poliartrite simétrica associada com o inchaço e dor em múltiplas articulações, com maior frequência de envolvimento das mãos e dos pés (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004). Esta é uma doença comum que afeta aproximadamente 1% da população mundial (WILLEMZE et al, 2012). O soro de aproximadamente 80% dos pacientes com AR contém fator reumatoide (FR), um auto-anticorpo dirigido contra a porção Fc da imunoglobulina G (IgG) (PERSSELIN, 1991).

A AR é considerada uma doença multifatorial, onde os principais fatores de risco para seu desenvolvimento incluem a susceptibilidade genética, sexo e idade, tabagismo, agentes infecciosos, hormonais, alimentares, socioeconômicos e étnicos (ALAMANOS e DROSOS, 2005). Comorbidades são comuns em pacientes com AR, e incluem hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemias, osteoporose, entre outras (Da MOTA et al., 2012). Já as comorbidades cardíacas são as mais cruciais, devido a sua frequência e impacto negativo sobre a saúde desses pacientes (GULLICK e SCOTT, 2011). A presença dessas comorbidades contribui para a diminuição da qualidade de vida e serve como significativos preditores de mortalidade em pacientes com esta patologia, devendo ser diagnosticadas e tratadas na fase inicial (Da MOTA et al., 2012).

O diagnóstico da AR é estabelecido através da combinação de sintomas e sinais clínicos, como dor articular, rigidez e edema simétrico poliarticular (sinovite). Testes laboratoriais, incluindo radiografias e testes sanguíneos podem fornecer informações que confirmem ou levem ao diagnóstico da AR (FARHEEN e AGARWAL, 2011). A orientação para o diagnóstico é baseada em critérios recentemente desenvolvidos em conjunto entre o *American College of Rheumatology* (ACR) / *European League Against Rheumatism* (EULAR) (ALETAHA et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), detectadas dentro da articulação inflamada, têm sido implicadas como mediadores inflamatórios na indução da AR (YU et al., 2012) juntamente com citocinas pró-inflamatórias, principalmente o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (CERHAN et al., 2003). O acúmulo de EROs danifica proteínas, lipídios e DNA, podendo também atuar como segundo mensageiro para a ativação do fator nuclear kappa-B (NF $\kappa$ B), e também servir como importantes moléculas sinalizadoras intracelulares que amplificam a resposta inflamatória proliferativa sinovial (FILIPPIN et al., 2008; HIRAO et al., 2011).

Além disso, a superprodução de EROs parece provocar uma modificação na região N-terminal da albumina sérica humana, esta mudança resulta na albumina modificada pela isquemia (IMA) (CAKIR et al., 2012), um marcador sensível para o diagnóstico da isquemia do miocárdio, que também se encontra aumentado em outras condições em que há produção de radicais livres, tais como cirrose hepática, infecções agudas e câncer avançado (SBAROUNI et al., 2011). Um novo marcador de estresse oxidativo, denominado de Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP), foi descrito pela primeira vez por WITKO-SARSAT e colaboradores, em 1996, após ser detectado no plasma de pacientes urêmicos crônicos. O AOPP é formado através da ação do estresse oxidativo sobre proteínas, especialmente a albumina (PIWOWAR et al., 2010). Os níveis plasmáticos de AOPP estão aumentados em pacientes com AR (BASKOL et al., 2006).

Considerando o fato de que a AR é um estado crônico que envolve diversas vias, tais como inflamação e estresse oxidativo, é de suma importância avaliar o perfil de novos biomarcadores para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta patologia. A importância do uso biomarcadores de estresse oxidativo é poder fornecer uma relação entre o dano oxidativo a macromoléculas como as proteínas, lipídios e DNA e várias doenças (FILIPPIN et al., 2008).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Artrite Reumatoide**

#### 2.1.1 Definição e epidemiologia

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica, de caráter autoimune, caracterizada por poliartrite periférica e simétrica, que leva à deformidade e destruição das articulações devido à erosão da cartilagem e do osso (BRASIL, 2006). Pacientes com AR estão em risco substancial para lesão articular progressiva, incapacidade e aumento da morbidade e mortalidade, o que justifica o diagnóstico precoce e o uso de esquemas terapêuticos mais agressivos (CUSH, 2007).

A prevalência mundial da AR é de 0,5% a 1%, podendo variar entre grupos populacionais (ALAMANOS e DROSOS, 2005). No Brasil, um estudo multicêntrico realizado em 1993, verificou a prevalência de AR em adultos variando de 0,2% a 1%, nas macrorregiões brasileiras (MARQUES NETO et al., 1993). Seu pico de incidência ocorre entre a quarta e sexta décadas de vida, acometendo duas a três vezes mais mulheres do que homens (GABRIEL, 2001).

#### 2.1.2 Manifestações clínicas

A AR é uma doença com características simétrica e erosiva, embora tenha uma apresentação clínica inicial variável, a doença costuma ter um início insidioso (GRASSI et al, 1998). Rigidez matinal nas articulações e inflamação poliarticular simétrica, em particular nas articulações metacarpofalangeanas (MCF),

interfalangeanas proximais (IFP), metatorsofalangeanas (MTF), bem como os punhos e os joelhos são típicos da doença (PERSSELIN, 1991). Perda de peso, fadiga e mal estar são sinais clínicos frequentes que podem estar associados a várias manifestações articulares como nódulos reumáticos, vasculite, anormalidades hematológicas, síndrome de Felty e envolvimento visceral (GRASSI et al., 1998). O envolvimento de outros órgãos, como coração, pulmão e sistema neurológico pode ser uma importante fonte de morbidade (PERSSELIN, 1991).

### 2.1.3 Fisiopatologia

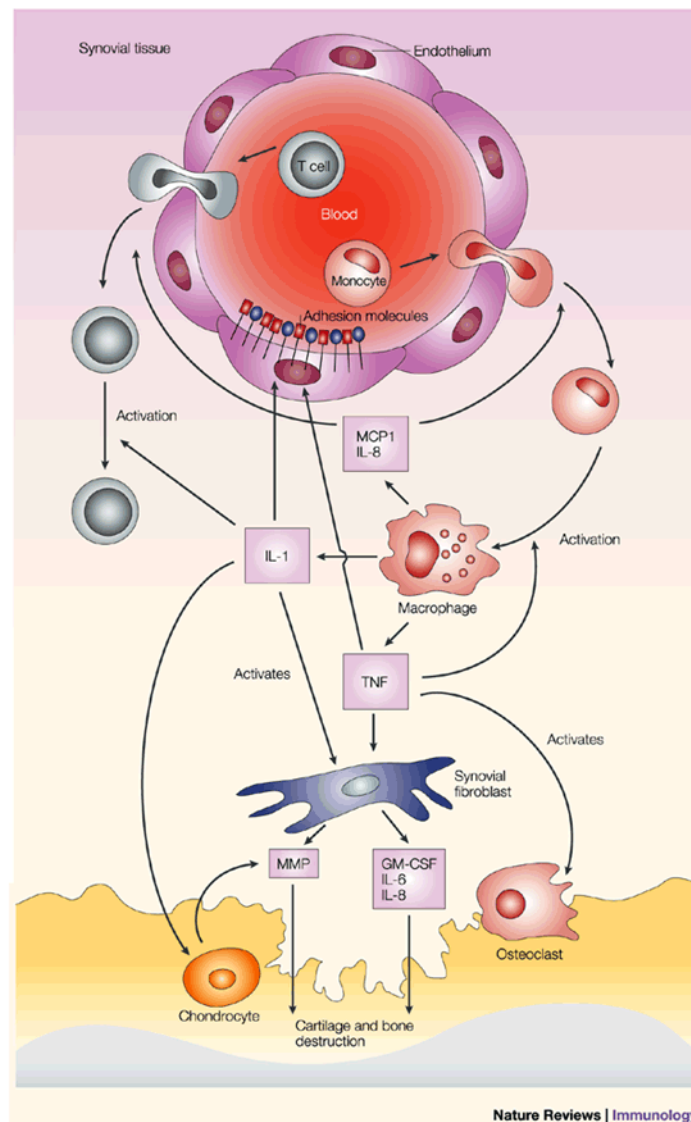
A etiologia da AR ainda é desconhecida, mas evidências apontam para uma interação entre fatores genéticos e ambientais (CHOY, 2012) assim como mecanismos que levam ao dano tecidual, como o estresse oxidativo (OSKAN et al., 2007). Entre os fatores ambientais que podem contribuir para o aparecimento da AR, o hábito de fumar é provavelmente o maior fator de risco para o desenvolvimento da doença (De HAIR et al., 2012), o tabagismo tem a propriedade de induzir o FR (TORIGOE e LAURINDO, 2006), sendo que pacientes fumantes com AR tem mais probabilidade de serem soropositivos (FR positivo) e ter títulos de FR mais elevados do que pacientes não fumantes com AR (GOODSON et al., 2008). Além disso, o tabagismo aumenta a gravidade do quadro articular e está associado a manifestações extra articulares da doença (PEREIRA et al., 2012).

Estudos recentes sugerem que o fator genético contribui com cerca de 60% da suscetibilidade para AR, sendo que a principal contribuição genética (cerca de 40%) parece estar ligada a presença dos antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II, mais especificamente as subclasses do HLA-DR4, sendo que os subtipos do HLA-DR4 relacionados com a AR são os alelos HLA-DRB1\*0401 e \*0404 (De VRIES et al., 2005; CRUZ-TAPIAS et al., 2012).

Após um evento desencadeante, possivelmente um acidente autoimune ou infeccioso, em indivíduos suscetíveis, uma resposta autoimune crônica é provocada com a proliferação de células T e B, aumento do fluxo sanguíneo na membrana sinovial e acúmulo de células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares. O tecido sinovial inflamado começa a crescer de forma irregular, formando o *pannus*

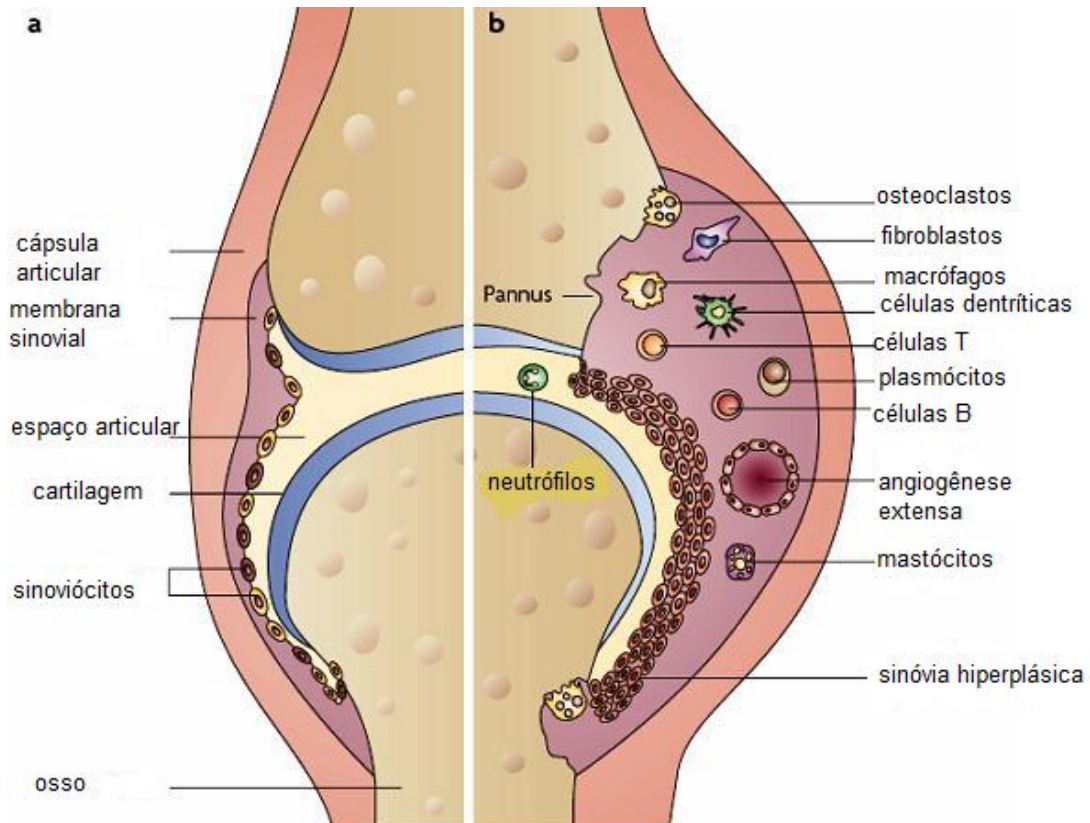
invasivo, o qual invade a cartilagem, levando a liberação de várias citocinas, interleucinas, proteinases e fatores de crescimento causando a destruição da cartilagem e osso (WEYAND e GORONZY, 1997; RINDFLEISCH e MULLER, 2005), conforme ilustrado nas figuras 1 e 2.

A inflamação articular provoca a ativação e proliferação do revestimento sinovial que normalmente é composto de macrófagos e fibroblastos. Estas células podem produzir citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), que pode aumentar a inflamação sinovial (YU et al., 2012). EROs contribuem para a doença através da indução de citocinas pró-inflamatórias, com conseqüente amplificação da resposta inflamatória (SUKKAR e ROSSI, 2004).



**Figura 1** - Representação esquemática dos eventos que ocorrem na artrite reumatoide. Reproduzido de POPE, 2002.





**Figura 2-** Comparação entre articulação normal e com artrite reumatoide. **a.** articulação normal; **b.** articulação com AR. Reproduzido e adaptado de SMOLEN e STEINER, 2003.

#### 2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da AR é estabelecido pela associação de dados clínicos, laboratoriais e radiográficos. A orientação para o diagnóstico era baseada em critérios de classificação revisados em 1987 pelo *American College of Rheumatology* (ACR; anteriormente, *American Rheumatism Association*) (ARNETT et al, 1988; SARAUX et al, 2001) apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Critérios de classificação da Artrite Reumatoide do *American College of Rheumatology* (ACR) de 1987\*

Critério	Definição
1. Rigidez matinal	Rigidez matinal dentro e ao redor das articulações com uma duração de pelo menos 1 hora antes da melhora máxima.
2. Artrite de 3 ou mais áreas	Pelo menos três áreas articulares com edema de partes moles ou derrame articular, observados por um médico.
3. Artrite de mão	Comprometimento das articulações metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e punhos.
4. Artrite simétrica	Envolvimento das mesmas áreas à direita e esquerda.
5. Nódulos reumatoides	Nódulo subcutâneo, sobre proeminências ósseas ou superficiais extensoras, ou regiões justa-articulares, observadas por um médico.
6. Fator reumatoide (FR)	Fator reumatoide sérico presente.
7. Alterações radiográficas	Alterações típicas de AR na radiografia anteroposterior de mãos e punhos, que devem incluir erosões e/ou osteopenia periarticular nas articulações das mãos e/ou punhos (alterações de osteoartrite não qualificam).

\*Para fins de classificação, o diagnóstico da AR é definido quando pelo menos 4 dos 7 critérios são preenchidos. Os critérios de 1 a 4 devem estar presentes por pelo menos 6 semanas. O diagnóstico não pode ser excluído quando apenas 2 critérios forem preenchidos. Adaptado de ARNETT et al., 1988.

No entanto, esses critérios tinham algumas limitações, pois não apresentavam um bom desempenho quando aplicados no início da doença, desta forma, tornou-se necessário o estabelecimento de novos critérios de classificação para a AR, enfocando a fase precoce da doença. Diante disso, um trabalho em conjunto entre o *American College of Rheumatology* (ACR) e *European League Against Rheumatism* (EULAR) desenvolveu recentemente uma nova abordagem (Figura 3) para a classificação da AR em uma fase inicial de evolução da doença (ALETAKHA et al., 2010; Da MOTA et al., 2011).

<b>População-alvo (quem deve ser testado?)</b>	
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).*	
Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença.	
*Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.	
<b>Acometimento articular (0-5)</b>	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3
> 10 articulações (pelo menos uma pequena)	5
<b>Sorologia (0-3)</b>	
FR negativo E ACPA negativo	0
FR positivo OU ACPA positivo em baixos títulos	2
FR positivo OU ACPA positivo em altos títulos	3
<b>Duração dos sintomas (0-1)</b>	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1
<b>AProvas de atividade inflamatória (0-1)</b>	
PCR normal E VHS normal	0
PCR anormal OU VHS anormal	1

Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR. O domínio **acometimento articular** refere-se a qualquer articulação dolorosa ou inchada (excluindo interfalangeanas distais do pé ou mão, primeira metatarsofalangeana e primeira carpometacarpena). Evidência adicional obtida por exames de imagem pode ser utilizada para confirmação dos achados clínicos. Consideram-se, para fins de classificação, como pequenas articulações as *metacarpofalangeanas*, *interfalangeanas proximais*, *metatarsofalangeanas (segunda a quinta)*, *primeira interfalangeana* e *punhos*, e como **grandes articulações ombros**, *cotovelos*, *quadril*, *joelhos*, *tornozelos*. *Articulações adicionais (temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, entre outras)* podem ser contadas, na avaliação de "mais de 10 articulações", desde que uma pequena articulação (ao menos) esteja acometida.

No domínio **sorologia**, considera-se o resultado de fator reumatoide ou de anticorpos anti-peptídeos/proteínas citrulinadas negativo se o valor encontrado for igual ou menor ao limite superior da normalidade para o respectivo laboratório; positivo baixo se o resultado encontrado for maior que o limite superior da normalidade, mas menor ou igual a 3 vezes o limite superior da normalidade; e positivo alto quando o valor encontrado for superior a 3 vezes o limite superior da normalidade. O domínio **duração dos sintomas** se refere ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da avaliação.

Já as **provas de atividade inflamatória** (velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa) são consideradas normais ou anormais de acordo com o valor de referência do laboratório utilizado.

**Figura 3** – Critérios de classificação para AR 2010 ACR/EULAR. Reproduzido de Da MOTA et al., 2011.

Não existe exames laboratoriais específicos para o diagnóstico da AR, no entanto, vários testes podem fornecer dados objetivos que aumentem a segurança do diagnóstico (RINDFLEISCH e MULLER, 2005). O *American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines (ACRSRA)*

recomenda que as avaliações laboratoriais iniciais incluam um hemograma completo diferencial, velocidade de hemossedimentação (VHS), fator reumatoide (FR) e proteína C-reativa (PCR), além disso, é recomendável uma avaliação renal e hepática, uma vez que muitos agentes antirreumáticos podem causar insuficiência renal ou hepática (ACR SUBCOMMITTEE ON RA GUIDELINES, 2002).

O FR é um auto anticorpo que reage contra a porção Fc da imunoglobulina G (IgG), descrito pela primeira vez em 1940 (BOSE e CALABRESE, 2012). É amplamente utilizado no diagnóstico da AR e se encontra presente em 50 a 80% dos pacientes, portanto a negatividade do FR não exclui o diagnóstico de AR. Apresenta também baixa especificidade (TASLIYURT et al, 2012), uma vez que pode ser detectado numa variedade de condições inflamatórias e infecciosas, podendo aumentar com a idade (BOSE e CALABRESE, 2012; TASLIYURT et al, 2012). Outros marcadores sorológicos como os anticorpos contra peptídeos cíclicos citrulinados (anti-CCP), de alta especificidade (95-98%) e sensibilidade entre 65 e 80%, podem auxiliar no diagnóstico precoce da AR, pois estariam presentes na fase inicial da doença, ou mesmo antes da fase clínica, e sua positividade pode fornecer informação prognóstica sobre a gravidade da doença (MIRIOVSKY et al, 2010).

A PCR e o VHS são marcadores de fase aguda que estão aumentados durante a inflamação. O VHS é influenciado pelos níveis séricos de proteínas de fase aguda do plasma, principalmente o fibrinogênio. Além de se encontrar elevado na AR, o VHS pode se elevar em outros estados inflamatórios como infecções e neoplasias, como também em estados não-inflamatórios em que a morfologia do eritrócito é alterada, incluindo anemia, idade avançada ou amostras de sangue armazenadas (FARHEEN e AGARWAL, 2011). A PCR é uma proteína sérica sintetizada pelos hepatócitos e se encontra aumentada em várias condições de infecções e inflamações, seus níveis elevados se correlacionam positivamente com a atividade da doença em pacientes com AR (YILDIRIM et al, 2004). A Tabela 2 resume os resultados de testes associados com a AR (RINDFLEISCH e MULLER, 2005).

TABELA 2 – Achados laboratoriais associados a AR

Testes laboratoriais	Achados associados
Proteína C reativa (PCR)	Tipicamente aumentado (>0,7 picogramas por mL), pode ser utilizado para monitorar o curso da doença.
Taxa de sedimentação de eritrócitos (VHS)	Frequentemente aumentada (>30mm por hora), pode ser utilizado para monitorar o curso da doença.
Hemoglobina/Hematócrito	Ligeiramente reduzida, média de hemoglobina em torno de 10g por dL, anemia normocrômica, também pode ser normocítica ou microcítica
Contagem de glóbulos brancos	Pode estar aumentada.
Plaquetas	Normalmente aumentadas.
Fator reumatoide (FR)	Negativo em 30% dos pacientes no início da doença, se inicialmente negativo, pode repetir de 6 a 12 meses após o início da doença. Pode ser positivo em outros processos como Lúpus. Não é uma medida precisa da progressão da doença.
Anticorpos contra peptídeos cíclicos citrulinados (anti-CCP)	Tende a se correlacionar bem com a progressão da doença. Sensibilidade aumentada quando usado em combinação com o FR. Mais específico que o FR. Não disponível em muitos laboratórios.

Adaptado a partir das informações de RINDFLEISCH e MULLER, 2005.

### 2.1.5 Tratamento

O tratamento da AR inclui a educação do paciente e de seus familiares sobre a sua doença, como esclarecimentos quanto às possibilidades evolutivas, terapêuticas e de prognóstico, terapias psico-ocupacionais e medicamentosas. Os medicamentos utilizados incluem o uso de anti-inflamatórios não hormonais (AINH) e corticoides (em baixa dose oral e/ou intra-articular) para controle da dor e do

processo inflamatório articular, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas e biológicas, que possuem a capacidade de reduzir os sinais e sintomas de atividade da AR e drogas imunossupressoras, restritas para formas mais severas da doença devido a sua considerável toxicidade. As DMCD (Metotrexato, Hidroxicloroquina, Sulfasalazina, Leflunomide, Azatioprina e Ciclosporina) devem ser utilizadas assim que o diagnóstico da AR for comprovado, sendo o Metotrexato (MTX) a droga de escolha. Na ausência de resposta com o MTX deve se pensar em outra DMCD ou combinação destas (BÉRTOLO et al, 2007; Da MOTA et al, 2012).

Atualmente, existem novos agentes modificadores da resposta biológica disponíveis no Brasil. Entre estes estão incluídos 3 agentes bloqueadores do fator de necrose tumoral (anti-TNF): infliximabe, adalimumabe e etanercepte (LAURINDO et al., 2004) o rituximabe, droga depletora do linfócito B; e o abatacepte, modulador da co-estimulação do linfócito T. Estas drogas estão indicadas para os pacientes que persistirem com a atividade da doença ou quando não responderem a pelo menos duas associações de DMCD incluindo o MTX (BÉRTOLO et al., 2007; Da MOTA et al., 2012). A Comissão de Artrite Reumatoide da Sociedade Brasileira de Reumatologia propõe um algoritmo de tratamento medicamentoso para a AR no Brasil (Da MOTA et al., 2012).

Os objetivos terapêuticos na AR incluem a preservação da função e da qualidade de vida, a minimização da dor e inflamação, assim como o controle de complicações sistêmicas (RINDFLEISCH e MULLER, 2005). É importante ressaltar que o diagnóstico precoce e tratamento mais agressivo na fase inicial da AR são fundamentais para o controle da atividade da doença e para prevenir incapacidade funcional e lesão articular irreversível (FARHEEN e AGARWAL, 2011).

## **2.2 Estresse Oxidativo e Artrite Reumatoide**

Radical livre é qualquer espécie com existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados ocupando orbitais atômicos ou moleculares (HALLIWELL, 1987), em geral são instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativos (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Essas espécies, cujo

elétron desemparelhado encontra-se centrado em átomos de oxigênio e nitrogênio recebem a dominação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), respectivamente (SILVA et al., 2011). O organismo humano sofre ação constante de EROs, como o superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso e ERNs como o óxido nítrico, geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos (BARREIROS et al., 2006).

EROs são geradas durante o metabolismo celular aeróbico normal, possuindo importante papel fisiológico na manutenção do estado celular redox, são importantes sinalizadoras intracelulares e formam uma parte integrante da defesa do organismo contra a invasão de agentes microbianos (HITCHON e EL-GABALAWY, 2004). Sob condições normais, a concentração destas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação (TOUYZ, 2004). Porém, em altas concentrações podem danificar macromoléculas celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas, podendo levar a morte subsequente (SILVA et al., 2011; HIRAO et al., 2011).

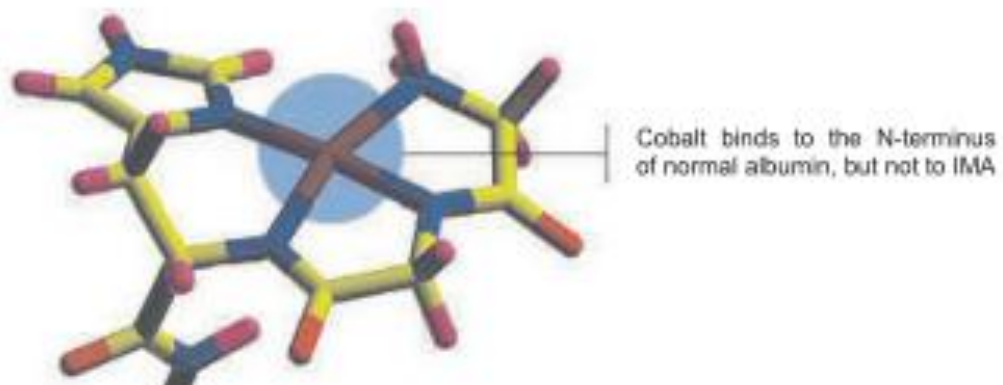
Antioxidantes são substâncias responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas por EROs, são classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. Os primeiros são representados pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR), enquanto que os não-enzimáticos incluem a vitamina A, vitamina E, betacaroteno e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BIANCHI e ANTUNES 1999; CUERDA et al., 2011). O estresse oxidativo é, portanto, o resultado do desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidante fisiológicas (ZHOU et al, 2010), causado por distúrbios na produção, distribuição ou por uma abundância de EROs a partir de fontes endógenas ou fatores ambientais, predominando a ação danosa dessas espécies sobre as células (SILVA et al., 2011).

O estresse oxidativo tem sido relacionado na patogênese de diversas doenças, e tem sido proposto como um importante contribuinte na lesão articular de pacientes com AR (KUNDU et al., 2011). Células presentes nas articulações inflamadas, como os macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais, uma vez isoladas e estimuladas, possuem a capacidade, de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs). Estes, na presença de moléculas de lipídios, DNA, proteínas, carboidratos ou proteoglicanos, provocam lesão oxidativa (MERRY et al., 1989). Grandes quantidades de EROs têm sido detectadas no líquido sinovial de

articulações reumáticas inflamadas (HIRAO et al., 2011) e essa grande quantidade pode levar a dano oxidativo ao ácido hialurônico, lipídios, matriz da cartilagem e ao DNA (YU et al., 2012).

A superprodução de radicais livres parece produzir uma modificação química na albumina sérica humana, o que resulta em um aumento da albumina modificada pela isquemia (IMA), o qual, por sua vez, parece desempenhar um papel como biomarcador de estresse oxidativo (DUARTE et al., 2009). A albumina plasmática é uma das mais abundantes proteínas circulantes no sangue, ela é sintetizada no fígado e sua diminuição no soro é associada com um risco aumentado de mortalidade bem como um aumento na incidência de doenças cardíacas (SBAROUNI et al., 2011). Esta proteína tem duas principais funções, manter a pressão coloidosmótica no fluido intravascular e servir de ligante para várias substâncias no plasma sanguíneo, como a bilirrubina, íons cálcio e magnésio, assim como diversas drogas. Uma diminuição desta proteína pode ser causada devido a diversas condições como doenças do fígado, ausência de fontes de aminoácidos em pacientes mal nutridos, doença renal, distúrbios gastrointestinais, entre outros (IMMANUEL e SANJAYA, 2006).

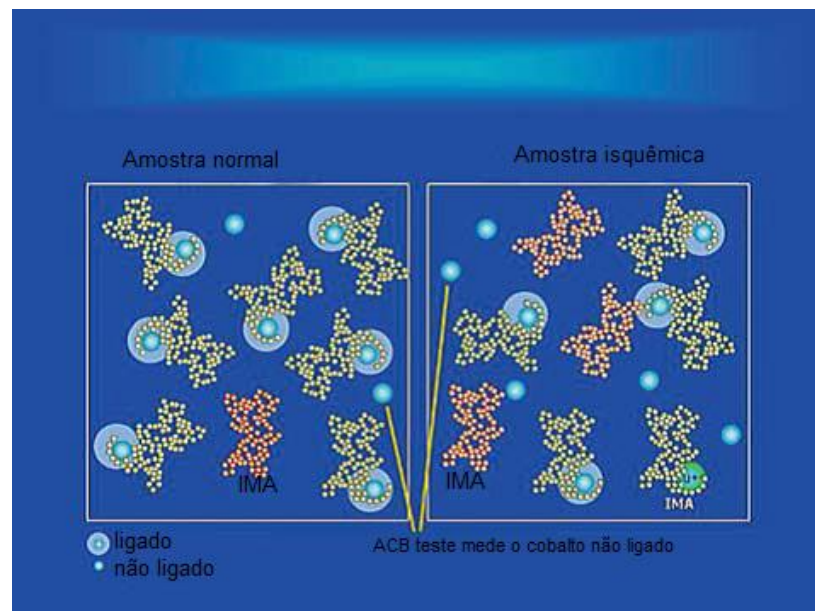
Sob condições fisiológicas normais, a extremidade amino-terminal (N-terminal) da molécula de albumina parece ser o principal sítio de ligação de metais de transição como o cobre, o cobalto e o níquel, no entanto, esta região é susceptível à degradação bioquímica e é menos estável sob condições ambientais (SINHA et al., 2003; SBAROUNI et al., 2008; CAKIR et al., 2012). A figura 4 ilustra a ligação do cobalto a região N-terminal da molécula de albumina.



**Figura 4** – Ligação do cobalto a região N-terminal da albumina normal. Reproduzido de IMMANUEL e SANJAYA, 2006.



Diversas condições como isquemia, hipóxia, acidose e lesão por EROs tornam essa capacidade de ligação com os metais diminuída, gerando uma variante metabólica da IMA (SBAROUNI et al., 2011; CAKIR et al., 2012). Tem sido proposto que EROs, como os radicais superóxido e hidroxil, gerados durante a isquemia-reperfusão miocárdica modificam a região N-terminal da albumina sérica resultando na formação da IMA (ROY et al., 2006). A mudança que ocorre na região N-terminal promove a redução da afinidade da albumina pelo cobalto, ficando este livre e em maior quantidade (BAR-OR et al., 2004; BAR-OR et al., 2008). Laboratorialmente, a IMA pode ser mensurada através do teste de ligação da albumina ao cobalto (*Albumin Cobalt Binding - ACB*), este ensaio detecta indiretamente a IMA através da diminuição da capacidade de ligação da albumina com o cobalto. Quando uma quantidade conhecida de cobalto é adicionada ao soro do paciente, estes se ligam a albumina normal, não a IMA, assim, um aumento da IMA está relacionado proporcionalmente ao cobalto não ligado, que pode ser medido espectrofotometricamente seguindo a adição de um reagente de coloração, como mostrado na figura 5 (SBAROUNI et al, 2011).



**Figura 5** – Teste de ligação da albumina ao cobalto. Reproduzido e adaptado de SBAROUNI et al, 2008.

Níveis séricos elevados de IMA tem sido proposto como um marcador sensível para o diagnóstico de isquemia do miocárdio antes do início de uma lesão cardíaca irreversível em pacientes com típica dor torácica aguda (CAKIR et al., 2012). Contudo, este aumento não é exclusivo de isquemia cardíaca, podendo os níveis de IMA estarem elevados em outras condições isquêmicas, como a isquemia cerebral, e doenças como a cirrose hepática, infecções agudas, cânceres avançados, diabetes *mellitus*, doença renal, entre outras (APPLE et al., 2005; SBAROUNI et al., 2008). Mediante uma exaustiva busca na literatura, não foram encontrados relatos da relação da albumina modificada pela isquemia (IMA) em pacientes com AR.

Os produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP), primeiramente caracterizados por WITKO-SARSAT et al. (1996), são decorrentes do estresse oxidativo causado pela ação de oxidantes cloraminados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas produzidos pela enzima mieloperoxidase (MPO) nos neutrófilos ativados. A enzima MPO catalisa a reação do íon cloreto com peróxido de hidrogênio, gerando grandes quantidades de ácido hipocloroso, importante na oxidação e cloração de substâncias (KETTLE et al., 1997). De acordo com CAPELLERE-BLANDIN et al. (2004) os AOPP são diretamente relacionados à oxidação da albumina, mas também de fibrinogênio e lipoproteínas (PIWOWAR, 2010). A estrutura do AOPP é similar aos produtos finais de glicação avançada (AGE), que tem a habilidade de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e expressão de moléculas de adesão (KALOUSOVÁ et al., 2002).

Os neutrófilos presentes nas articulações inflamadas de pacientes com AR têm sido considerados como mediadores da destruição dos tecidos nestes pacientes. Além de serem capazes de produzir EROs, quando ativados, estas células também são capazes de promoverem a liberação da enzima MPO e consequentemente a geração de oxidantes clorados. Estes, por sua vez, reagem rapidamente com aminoácidos e proteínas formando os AOPP (BASKOL et al., 2006). O AOPP vem sendo considerado um marcador confiável para avaliar o grau de dano proteico mediado por oxidação (WITKO-SARSAT et al., 1996). Na AR, aparecem como novos marcadores associados com o estresse oxidativo, bem como mediadores inflamatórios capazes de amplificar a ativação dos neutrófilos (BASKOL et al., 2006), também possuem vantagens sobre outros marcadores devido a sua

rápida formação, grande estabilidade e confiabilidade e longa meia-vida (DALLE-DONNE et al., 2003).

O acúmulo de AOPP também tem sido relatado, por diversos estudos, em outras doenças autoimunes além da AR e/ou condições associadas com inflamação crônica tais como o diabetes mellitus (KALOUSOVÁ et al., 2002; PIWOWAR et al., 2007), alguns tipos de câncer (TESAROVA et al., 2007; AVINASH et al., 2009), síndrome coronariana aguda (SKVARILOVA et al., 2005).

### **2.3 Proteína C - reativa e Artrite Reumatoide**

A inflamação é considerada uma resposta do organismo a qualquer processo capaz de causar lesão celular ou tecidual, é um processo fisiológico em resposta a diferentes estímulos como infecções, alterações físico-químicas e antigênicas ou danos traumáticos. Essa resposta é comum a vários tipos de tecidos e é mediada por diversas substâncias produzidas pelas células danificadas e células do sistema imunitário (VIANNA et al., 2011). Processos inflamatórios são as principais causas para início de uma resposta de fase aguda pelo organismo (STREETZ et al., 2001). Esta resposta é acompanhada por um aumento na síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, que estão envolvidas no reestabelecimento da homeostase (MOSHAGE, 1997).

A AR é uma doença crônica caracterizada pela inflamação sinovial, que leva a destruição do osso e cartilagem, estudos sugerem que citocinas, um grupo de proteínas de baixo peso molecular, desempenham um papel patológico na AR, mediando a inflamação aguda e crônica, como também a destruição do tecido conjuntivo (DUFF, 1994; VERVOORDELDONK e TAK, 2002). Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  conhecidos iniciadores da cascata de ativação do NF-kB, são responsáveis pela perpetuação do processo inflamatório na AR (FILIPPIN et al., 2008), além disso, o TNF- $\alpha$  é conhecido por aumentar a produção de EROs (BINIECKA et al., 2011), sendo que altas concentrações de EROs podem atuar como segundos mensageiros envolvidos na ativação do NF-kB e com isso a manutenção do processo inflamatório (HIRAO et al., 2011). Nesse contexto, as citocinas como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e o TNF- $\alpha$ , produzidas no local da

inflamação, desempenham importante papel na resposta de fase aguda deste processo, induzindo a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, entre as quais se destaca a proteína C reativa (PCR) (BILATE, 2007).

A PCR é classificada como uma proteína de fase aguda devido a sua maior concentração no soro durante uma infecção e inflamação (YILDIRIM et al., 2004). O aumento rápido da concentração desta proteína no soro geralmente reflete a extensão da injúria tecidual e na ausência de estímulo, os níveis séricos diminuem rapidamente, no entanto, níveis persistentemente elevados são observados em estados inflamatórios crônicos como na fase ativa da AR (FARHEEN e AGARWAL, 2011), ou seja, existe uma correlação positiva entre os níveis séricos de PCR e a atividade da doença na AR (YILDIRIM et al., 2004). Na prática clínica a PCR é frequentemente utilizada como um dispositivo de rastreio para a inflamação, um marcador para a atividade da doença e como um auxiliar de diagnóstico (CLYNE e OLSHAKER, 1999).

Desta forma, elucidar os fatores que estão envolvidos no processo inflamatório da AR é extremamente relevante, pois estes poderão vir a auxiliar no diagnóstico precoce da doença, o que tem se mostrado relevante para melhorar o prognóstico da patologia.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os níveis de albumina modificada pela isquemia em pacientes com artrite reumatoide.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Investigar o comportamento de biomarcadores associados ao estresse oxidativo (IMA e AOPP) em pacientes com AR e em indivíduos saudáveis;
- Avaliar os níveis de proteína de fase aguda PCR em pacientes com AR e em indivíduos saudáveis;
- Avaliar a função renal em pacientes com AR e em indivíduos saudáveis;
- Avaliar os índices hematimétricos (Hg, Hct e VCM) em pacientes com AR e em indivíduos saudáveis;
- Avaliar os níveis de fator reumatoide (FR) em pacientes com AR e em indivíduos saudáveis.

## 4. ARTIGO

O artigo apresentado a seguir inclui as seções “Materiais e Métodos”, “Resultados” e “Discussão” desta dissertação. O qual está disposto no formato exigido pela revista *Clinical Laboratory*.

## SHORT COMMUNICATION

### **Assessment of ischemia-modified albumin levels in patients with rheumatoid arthritis**

Michele R. Leitemperguer<sup>1</sup>, Etiane Tatsch<sup>1,2</sup>, Helena Kober<sup>1,3</sup>, José Antônio M. De Carvalho<sup>1,2</sup>, Rafael N. Moresco<sup>1,2,3</sup>, José Edson P. Da Silva<sup>1</sup>

\*Corresponding author: José Edson Paz da Silva

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1216, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Tel.: +55 55 32208464; Fax: +55 55 32208018

E-mail: jepazdasilva@gmail.com

**Declaration of Interest:** There are no conflicts of interest to declare.

**Running title:** IMA levels in rheumatoid arthritis.

---

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

## SUMMARY

*Background:* Oxygen metabolism has an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). Abundant amounts of ROS have been identified in the synovial fluid of RA patients. The accumulation of ROS in cells also serves as important intracellular signaling molecules that amplify the synovial inflammatory-proliferative response. Thus, the aim of this study was to assess the IMA levels and other oxidative stress and inflammatory biomarkers in RA subjects.

*Methods:* IMA, AOPP, CRP, hemoglobin, Hct, MCV, RF, creatinine, urea levels were assessed in 16 RA subjects and 20 healthy controls.

*Results:* IMA levels were significantly higher in the RA group than in the control group ( $0.495 \pm 0.01$  vs  $0.433 \pm 0.02$  ABSU,  $P=0.038$ ). No significant differences were observed for the other markers studied.

*Conclusions:* This study demonstrated that RA is related to oxidative stress and inflammation. We also showed for the first time an increase of IMA levels in RA subjects, suggesting that this pathology promotes the raise of oxidative stress process.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis, reactive oxygen species, ischemia-modified albumin, C-reactive protein, advanced oxidation protein products

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory, autoimmune disease that involves hyper-proliferation of the synovial membrane, leading to joint and bone damage [1]. Articular inflammation causes activation and proliferation of the synovial lining that is usually composed of macrophage and fibroblast [2]. RA affects 0.5% to 1% of world population, is more frequent in females than males (two or three times more) and can start at any age. However, its greatest incidence occurs between the fourth and sixth decade of life [3]. Patients with RA have a higher chance of having other co-morbidities; some are casually associated with RA and others are related to

their treatment. However, regardless of their underlying pathogenesis, these diseases contribute to a lower life expectancy and increased mortality in RA [4].

The diagnosis of RA is established through the association of a number of symptoms and clinical signs as well as laboratory and radiological findings. The guidance for the diagnosis is based on the classification criteria of the American College of Rheumatology (ACR) / European League Against Rheumatism (EULAR) [5]. Among the laboratory markers of inflammatory activity used to assess RA activity is the dosage of C-reactive protein (CRP), this test is not specific for RA though [6]. Since CRP is, an acute phase protein, it can be used in the evaluation of patients with inflammatory disorders of any nature, ie, indicator of inflammatory processes resulting from infection, carcinomas, trauma and surgery [7]. CRP levels may also vary according to the age, sex [6], smoking, hypertension and obesity [8]. Another biomarker used in the diagnosis of RA is the rheumatoid factor (RF), which is an autoantibody that reacts against the Fc portion of immunoglobulin IgG [9]. Its specificity and sensitivity are limited, especially in early RA, since 30% to 40% of patients, at the onset of disease, may be negative for this autoantibody [10].

Oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) has been proposed as a major mechanism contributing to the joint tissue damage in RA patients [11]. Cells present in the inflamed joint, such as macrophages, neutrophils, lymphocytes, and endothelial cells are all capable of producing ROS when isolated and stimulated. When, stimulated in the environment of critical biomolecules such as lipids, proteins, DNA, carbohydrates, they promote oxidative damage [12]. In this context, the overproduction of ROS and inflammatory process may modify the N-terminal region of the human serum albumin. This change results in ischemia-modified albumin (IMA), a sensitive marker for the diagnosis of myocardial ischemia [13], which is also increased in other pathologies such as liver cirrhosis [14], pulmonary embolism [15], and end stage renal disease [16], among others. In 1996, a novel oxidative stress biomarker, referred to as advanced oxidation protein products (AOPP), was detected in the plasma of chronic uremic patients. AOPP levels are a measure of highly oxidized proteins, especially albumin [17] [18]. An increase in the plasma of AOPP has been reported in pathological conditions such as diabetes *mellitus* [19] [20], cancer [21] [22], acute coronary syndrome [23] and RA [24].



Thus, considering the fact that RA is a chronic state that involves diverse pathways such as inflammation and oxidative stress, the aim of this study was to assess the IMA levels and other oxidative stress and inflammatory biomarkers in RA subjects.

## **MATERIALS AND METHODS**

This case-control study included 36 volunteers enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The subjects were divided into two groups: rheumatoid arthritis (n=16) and control (n=20). Rheumatoid arthritis was diagnosed according to 2010 ACR/EULAR criteria [5]. Exclusion criteria for the study included patients with HIV, cancer, diabetes *mellitus*, renal failure, hypertension and pregnant patients. This study protocol was approved by the Local Research Ethics Committee (number: 0186.0.243.000-11).

Anthropometric measurements with emphasis to clinical markers of adiposity were obtained. Body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight (kg) with height (m<sup>2</sup>). Waist circumference (cm) was measured in average distance between the last rib and iliac crest, around the navel. All patients answered to a clinical and epidemiological assessment evaluating the practice of physical exercises, smoking, hypertension and treatment with drugs.

Blood samples were collected from all subjects after an overnight fast by venous puncture technique into Vacutainer<sup>®</sup> (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA anticoagulants and no anticoagulants. Specimens were routinely centrifuged at 2500 x g for 15 min at 4°C. Hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb) and mean corpuscular volume (MCV) were measured in whole blood collected in EDTA tubes. Plasma was used for the measurement of fasting glucose and AOPP, and serum was used to assess the concentrations of RF, creatinine, urea, CRP and IMA. All assays were performed at Cobas Mira<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer, except RF that was measured in automated immunochemistry analyzer Dimension<sup>®</sup> Xpand<sup>®</sup> Plus (Siemens) as well as Hct, Hb and MCV which were measured in automated hematology analyzer Sysmex<sup>®</sup> XE-

2100. Serum IMA was measured by colorimetric assay based on biochemical properties of albumin to bind exogenous cobalt as previously described [25]. AOPP was measured as previously reported [26].

Distribution of variables was tested by use of Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables were presented as mean and standard deviation (SD), and comparisons between groups were performed with Student's *t* test. Categorical data were summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with Chi-square test. Statistical significance was assumed at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Baseline characteristics of study participants are described in Table 1. Among RA patients, 75% of them take glucocorticoids and disease-modifying antirheumatic drugs. RA patients had significantly higher levels of RF than control subjects. IMA levels were significantly higher in the RA group than the control group ( $0.495 \pm 0.01$  vs  $0.433 \pm 0.02$  ABSU,  $P=0.038$ ), as shown in Figure 1. No significant differences were observed for fasting glucose, Hct, Hb, MCV, creatinine, urea, CRP, and AOPP.

**Please add the Table 1 here**

**Please add the Figure 1 here**

## DISCUSSION

The results of the present study showed that RA is related to inflammation and oxidative stress, as studied previously [27] [28] [29]. However, to the best of our knowledge, this is the first study reporting increased levels of IMA in RA. Regarding the pathobiology of RA, oxidative stress is an important mechanism that underlies destructive and proliferative synovitis [30] [31]. Neutrophils, the main cells of inflamed synovial fluid in RA, produce ROS, especially superoxide anion. Above normal

concentrations, ROS damage lipids, proteins, membranes, and nucleic acids. Also, ROS can act as a second messenger to activate nuclear factor kappa-B (NF $\kappa$ B) and serve as important signalling intracellular molecules that amplify the synovial inflammatory-proliferative response [32] [33]. Moreover, ROS can induce pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), followed by an inflammatory response [32].

In this study, higher level of IMA and an increased inflammatory response were associated with RA. Under various conditions such as ischemia, hypoxia, acidosis and superoxide-radical injury, the metal binding capacity of albumin to transition metals such as copper, nickel, and cobalt is reduced, generating a metabolic variant of the protein [13]. Overproduction of free radicals may produce a chemical modification of human serum albumin (HSA), resulting in an increased IMA, which in turn seems to play a role as an oxidative stress biomarker [34]. The native structure of HSA, specially the intact N-terminal and a free thiol group on cys34, is essential to occur albumin cobalt binding. However, ROS cause damages to the N-terminal resulting in the cleavage of the two terminal amino acids. Furthermore, ROS promote the oxidation of cys34 of HAS, which results in less cobalt binding to HSA and consequently more free cobalt, increasing IMA assay levels [35][36].

Accumulating evidence suggests that inflammatory processes mediate the development and progression of RA [37]. CRP is frequently used as a marker of the acute-phase response; it has a short half-life and consequently is a sensitive measure of cytokine-induced protein synthesis [38]. Moreover, CRP is produced in the liver in response to IL-6 and is a useful biochemical marker to evaluate the disease activity of patients with RA [39]. In this study, we observed higher levels of CRP in RA subjects, although not being statistically significant different. This, may be due to the fact that patients were treated with a broad range of comedications (e.g., glucocorticoids and disease-modifying antirheumatic drugs) which could influence CRP level [39] [40] [41] [42] reducing inflammatory activity in these patients [43]. Another aspect of CRP is its association with a risk of cardiovascular complications (CV) [44]. Interventions leading to a reduction in the CRP level significantly reduced the incidence of the first major CV event and death from any cause [45]. Previous studies indicated that the use of prednisone, an anti-inflammatory widely used in the

treatment of RA, appears to lower the levels of IL-6, a pro-inflammatory cytokine, producing a beneficial in AR symptoms [43] [46].

Despite evidence that oxidative stress plays a role in RA, few data are available concerning the occurrence of protein oxidation. Proteins are among the main targets of oxidation in the plasma because they are major components of plasma [47]. Examination of individual serum proteins may be useful in establishing specific pathways of oxidative stress *in vivo* and in determining the potential functional consequences of oxidant stress exposure [48]. The attack of ROS modifies amino acid, lysine, arginine, proline, and histidine residues generating carbonyl moieties and action of chloraminated oxidants, mainly hypochlorous acid and chloramines, produced by myeloperoxidase in activated neutrophils. This attack forms dityrosine containing cross-linked protein products known as AOPP, which is identified as an early marker for oxidative stress and inflammation and is used as a measure of protein damage [17] [49] [50]. We reported in this study, even not being statistically significant, the higher levels of AOPP in RA subjects, indicate a higher oxidation of proteins in RA. AOPP is formed during oxidative stress by the reaction of plasma protein with chlorinated oxidants [17], and it was suggested as a measure of highly oxidized proteins, especially albumin [22]. Recently, Baskol et al. (2006) found in a study involving patients with RA, that AOPP levels were significantly higher in RA subjects than in the control group [24]. Indeed, this study demonstrated that AOPP, which arise from the reaction between chlorinated oxidants and proteins, constitute a new molecular basis for the deleterious activity of oxidants and may be considered as true mediators of the pro-inflammatory effects of oxidative stress [24, 26].

In conclusion, the present study demonstrates that RA is related to oxidative stress and inflammation. We have also demonstrated for the first time an increase of IMA levels in RA subjects, suggesting that this pathology promotes the raise of oxidative stress process. However, further studies are required to investigate this assessment in a larger population, especially a longitudinal study to demonstrate if IMA is an early marker of oxidative stress in RA.

## REFERENCES

1. Gravallesse EM. Bone destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(Suppl 2): 84-6.
2. Yu DH, Yi JK, Yuh HS, et al. Over-expression of extracellular superoxide dismutase in mouse synovial tissue attenuates the inflammatory arthritis. *Exp Mol Med* 2012; 44(9): 529–535.
3. Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27(2):269-81.
4. Gullick NJ, Scott DL. Co-morbidities in established rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011; 25(4):469-83.
5. Aletaha D, Neogi T, Silman A. et al. The 2010 American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(9):2569-2581.
6. Da Mota LM, dos Santos Neto LL, de Carvalho JF. Autoantibodies and other serological markers in rheumatoid arthritis: predictors of disease activity? *Clin Rheumatol* 2009; 28(10):1127-34.
7. Du Clos TW, Mold C. The role of c-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14(3):289-93.
8. Matt MP, Kluff C. Determinants of c-reactive protein concentration in blood. *Ital Heart* 2001; 2(3):189-195.
9. Spector TD, Hart DJ, Powell RJ. Prevalence of rheumatoid arthritis and rheumatoid factor in women: evidence for a secular decline. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1993; 52: 254-257.
10. Renaudineau Y, Jamin C, Saraux A, Youinou P. Rheumatoid factor on a daily basis. *Autoimmunity* 2005; 38:11-6.

11. Kundu S , P Ghosh , Datta S , et al. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with Rheumatoid Arthritis. *Free Radic Res* 2012.
12. Merry P, Winyard PG, Morris CJ, et al. Oxygen free radicals, inflammation, and synovitis: the current status. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 864-870.
13. Cakir M, Karahan SC, Mentese A, et al. Ischemia-modified albumin levels in children with chronic liver disease. *Gut and Liver* 2012; 6 (1) :92-7.
14. Chen CY, Tsai WL, Lin PJ, et al. The value of serum ischemia-modified albumin for assessing liver function in patients with chronic liver disease. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:1817–21.
15. Turedi S, Patan T, Gunduz A, et al. Ischemia-modified albumin in the diagnosis of pulmonary embolism: an experimental study. *Am J Emerg Med* 2009; 27(6):635–40.
16. Turedi S, Cinar O, Yavuz I, et al. Differences in ischemia-modified albumin levels between end stage renal disease patients and the normal population. *J Nephrol* 2010; 23:335–40.
17. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Chapeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress uremia. *Kidney Intern* 1996; 49:1304-1313.
18. Liang X, Chen Y, Zhuang J, et al. Advanced oxidation protein products as prognostic biomarkers for recovery from acute kidney injury after coronary artery bypass grafting. *Biomarkers* 2012; 17(6): 507–512.
19. Kalousová M, Skrha J, Zima T. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Diabetes Mellitus. *Physiol Res* 2002; 51(2): 597-604.
20. Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. AOPP and its relation with selected markers of oxidative/antioxidative system in type diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77:188-192.

21. Tesarova P, Kalousova M, Soukupova J, et al. Carbonyl and oxidative stress in patients with breast cancer—is there a relation to the stage of the disease? *Neoplasma* 2007; 54: 219-224.
22. Avinash SS, Anitha M, Vinodchandran, et al. Advanced oxidation protein products and total antioxidant activity in colorectal carcinoma. *Indian J Physiol Pharmacol* 2009; 53: 370-4.
23. Škvařilová M, Bulava A, Stejskal D, et al. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Biomed Papers* 2005; 149 (1), 83-87.
24. Baskol G, Demir H, Baskol M, et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 2006; 24:307-311.
25. Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JAM, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010;43:450-54.
26. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, et al. Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. *J Immunol* 1998; 161(5): 2524-2532.
27. Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2008; 7:195-202.
28. Biemond P, Swaak AJ, Koster JF. Protective factors against oxygen free radicals and hydrogen peroxide in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1984; 27:760–765.
29. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:265-278.
30. Mapp PI, Grootveld MC, Blake DR. Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 1995;51:419–36.

31. Tak PP, Zvaifler NJ, Grenn DR, et al. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunol Today* 2000;21:78–82.
32. Sukkar SG, Rossi E. Oxidative stress and nutritional prevention in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2004;3:199–206.
33. Çimen MYB, Çimen ÖB, Kaçmaz M, et al. Oxidant/antioxidant status of erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2000;19:275–7.
34. Duarte MMMF, Rocha JBT, Moresco RN, et al. Association between ischemia modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009;42:666-71.
35. Bar-Or D, Curtis CG, Sullivan A, et al. Plasma albumin cysteinylolation is regulated by cystathionine beta-synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1449–53.
36. Bar-Or D, Rael LT, Bar-Or R, et al. The cobalt-albumin binding assay: insights into its mode of action. *Clin Chim Acta* 2008;387:120-7.
37. Cush JJ. Early rheumatoid arthritis—is there a window of opportunity? *J Rheumatol Suppl.* 2007;80:1–7.
38. Galeazzi M, Morozzi G, Veronesi M, Ronconi S, Magi B, Bini L, Marcolongo R. Usefulness of the determination of C reactive protein and other acute phase proteins in rheumatoid arthritis. *Recenti Prog Med* 1995; 86(11):456-62.
39. Yildirim K, Karatay S, Melikoglu MA, et al. Associations between acute phase reactant levels and disease activity score (DAS28) in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Clin Lab Sci* 2004, 34:423-426.
40. Smolen JS, Aletaha D, Grisar J, et al. The need for prognosticators in rheumatoid arthritis. Biological and clinical markers—where are we now? *Arthritis Res Ther* 2008;10:208.
41. Aletaha D, Smolen JS. The rheumatoid arthritis patient in the clinic: comparing more than 1,300 consecutive DMARD courses. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1367- 74.



42. Dessein PH, Joffe BI, Stanwix AE. High sensitivity C-reactive protein as a disease activity marker in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004;31:1095-1097.

43 Kirwan JR, Buttgerit F. Symptom control with low-dose glucocorticoid therapy for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(Suppl 4):14-20.

44. Kaptoge S, Di AE, Lowe G, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant metaanalysis. *Lancet* 2010;375:132–40.

45. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008;359:2195–207.

46. Clarke L, Kirwan J. Efficacy, safety and mechanism of action of modified-release prednisone in rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012; 4(3): 159-166.

47. Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, et al. Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clin Chim Acta* 2006; 372: 147–153.

48. Dear RT, Fu S, Stocker R, et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997;324:1–18.

49. Piwowar A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. *Pol Merkur Lekarski* 2010; 28(164):166-9.

50. Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2010; 43:508-511.

**Table 1.** Characteristics of study patients

(continues)

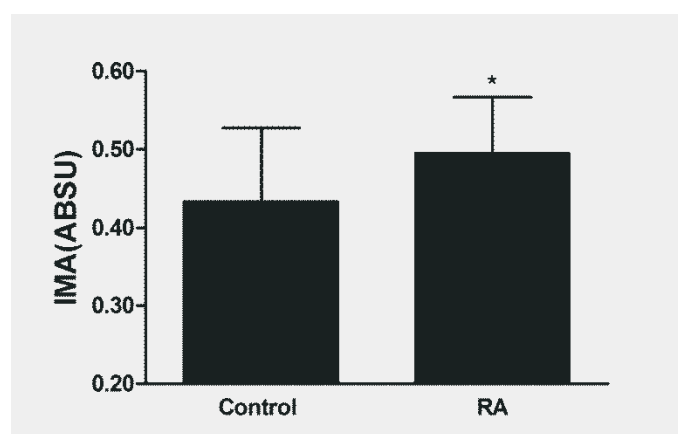
	<b>Control</b>	<b>Rheumatoid Arthritis</b>	<b>P-value</b>
Age (years)	51.3 ± 2.0	57.7 ± 2.8	0.072

			(conclusion)
Male (%)	25.0	31.2	0.722
Smokers (%)	25	18.7	0.708
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25.9 ± 0.8	27.5 ± 1.5	0.346
Fasting glucose (mmol/L)	4.9 ± 0.09	5.4 ± 0.2	0.063
Rheumatoid factor (UI/mL)	10.9 ± 0.3	37.9 ± 8.1	<0.001
Creatinine (µmol/L)	76.2 ± 3.0	85.2 ± 9.0	0.312
Urea (mmol/L)	11.4 ± 0.5	12.2 ± 0.6	0.382
AOPP (µmol/L)	43.1 ± 3.0	51.3 ± 10.8	0.428
CRP (mg/L)	10.7 ± 2.3	13.7 ± 4.0	0.498
Hemoglobin (g/dL)	13.7 ± 0.2	13.3 ± 0.5	0.458
Hct (%)	41.3 ± 0.7	41.1 ± 1.5	0.894
MCV (micra <sup>3</sup> )	89.9 ± 1.2	90.9 ± 1.2	0.557

Data are expressed as mean and SD or percentages

### FIGURE LEGEND

**Figure 1.** Concentrations of IMA observed in study population. \*P<0.05 compared to normal subjects.



## 5. CONCLUSÕES

- Demonstrou-se neste estudo a existência de uma relação entre AR, estresse oxidativo e inflamação;
- Um aumento significativo dos níveis de albumina modificada pela isquemia (IMA) em pacientes com AR sugere que esta patologia promove o aumento do estresse oxidativo;
- Níveis significativamente maiores do fator reumatoide (FR) em pacientes com AR do que os controles saudáveis confirmam a atividade da doença nesses pacientes;
- No entanto, mais estudos são necessários para investigar essa avaliação em uma população maior, especialmente um estudo longitudinal para demonstrar se IMA é um marcador precoce de estresse oxidativo na AR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACRSRA, American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update. **Arthritis Rheum**, v.46, p. 328–46, 2002.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v.4, n.3, p.130-6, 2005.

ALETAHA D. et al. The 2010 American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheum**, v.62, n.9, p. 2569-2581, 2010.

ANDRIOLO, A.; COSTA, R. P.; FERREIRA, N. Novo Pró-calcitonina e proteína C reativa em processos infecciosos graves. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v.40, n. 3, p.169-74, 2004.

APPLE, F. S. et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. **Clin.Chem**, v. 51, n. 5, p. 810-824, 2005.

AVINASH, S. S. et al. Advanced oxidation protein products and total antioxidant activity in colorectal carcinoma. **Indian J Physiol Pharmacol**, v.53, p. 370–4, 2009.

BAR-OR, D. et al. Plasma albumin cysteinylolation is regulated by cystathionine beta-synthase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 325, p.1449–53, 2004.

\_\_\_\_\_. The cobalt-albumin binding assay: insights into its mode of action. **Clin Chim Acta**, v.387, p.120-7, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S; DAVID J. M.; DAVID J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **SBQ**, v.29, n.1, p.113-23, 2006.

BASKOL, G. et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochem Funct**, v.24, p. 307–311, 2006.

BÉRTOLO, M. B. et al. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, 2007; v. 47, n.3, p.151-9, 2007.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v.12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.8, n.2, p. 47-51, 2007.

BINIECKA, M. et al. Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis. **Arthritis Res Ther**, v.13, n.4, p. R121, 2011.

BOSE, N.; CALABRESE, L. H. Q: Should I order an anti-CCP antibody test to diagnose rheumatoid arthritis? **Cleve Clin J Med**, v. 79, n. 4, p. 249-52, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria SCTIE nº 66 de 06 de novembro de 2006. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Artrite Reumatoide. Disponível em:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt\\_artrite\\_reumatoide\\_2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_artrite_reumatoide_2006.pdf).  
Acessado em: 10 de novembro de 2012.

CAKIR, M. et al. Ischemia-modified albumin levels in children with chronic liver disease. **Gut and Liver**, v.6, n. 1, p. 92-7,2012.

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. et al. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biochim Biophys Acta**, v.1689, n.2, p.91-102, 2004.

CERHAN, J. R. et al. Antioxidant Micronutrients and Risk of Rheumatoid Arthritis in a Cohort of Older Women. **Am J Epidemiol**, v.157, n. 4, p.345–354, 2003.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 51, Suppl 5, p.3-11, 2012.

CLYNE, B.; OLSHAKER, J. S. The C-reactive protein. **J Emerg Med**, v.17, n.6, p.1019-25, 1999.

CRUZ-TAPIAS, P. et al. Shared HLA Class II in Six Autoimmune Diseases in Latin America: A Meta-Analysis. **Autoimmune Dis.** 2012.

CUERDA, C. et al. Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. **Nutr Hosp**, v. 26, n. 1, p. 68-78, 2011.

CUSH, J. J. Early rheumatoid arthritis -- is there a window of opportunity? **J Rheumatol**, v. 80, p.1-7, 2007.

DA MOTA, L. M. H. et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v.51, n.3, p.199-219, 2011.

\_\_\_\_\_. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v.52, n.2, p.135-174, 2012.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, n.1-2, p. 23-38, 2003.

DE HAIR, M. J. et al. Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** 2012.

DE VRIES, R. R.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E. Redefining the HLA and RA association: to be or not to be anti-CCP positive. **J Autoimmun**, v. 25 Suppl: 21-5, 2005.

DUARTE, M. M. M. F. et al. Association between ischemia modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. **Clin Biochem**, v.42, p.666-71, 2009.

DUFF, G. W. Cytokines and acute phase proteins in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol Suppl**, v.100, p.9-19, 1994.

FARHEEN, K.; AGARWAL, S. K.. Assessment of Disease Activity and Treatment Outcomes in Rheumatoid Arthritis. **J Manag Care Pharm**, v.17, n.9, p.S9-S13, 2011.

FILIPPIN, L. I. et al. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide [Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis]. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

GABRIEL, S. E. The epidemiology of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v.27,n.2, p.269-81, 2001.

GOODSON, N. J.; FARRAGHER, T. M.; SYMMONS, D. P. M. Rheumatoid Factor, Smoking, and Disease Severity: Associations with Mortality in Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol**, v. 35, n.6, p.945-949, 2008.

GRASSI, W. et al. The clinical features of rheumatoid arthritis. **Eur J Radiol**, v.27, Suppl 1, p.S18-24, 1998.

GULLICK, N. J.; SCOTT, D. L. Co-morbidities in established rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v.25, n.4, p.469-83, 2011.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEBJ**, v.1, p. 358-364; 1987.

HIRAO, M. et al. Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. **Rheumatol Int**, 2011.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 6, p.265-278, 2004.

IMMANUEL, S.; SANJAYA, A. I. Albumin Cobalt Binding (ACB) Test: Its Role as a Novel Marker of Acute Coronary Syndrome. **Acta Med Indones**, v.38, n.2, p.92-6, 2006.

KALOUSOVÁ, M.; SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Diabetes Mellitus. **Physiol. Res**, v. 51, n.2, p. 597-604, 2002.

KAPTOGE, S. et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant metaanalysis. **Lancet**, n.375, p.132–40, 2010.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Report**, v.3, n.1, p.3-15, 1997.

KUNDU, S. et al. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with Rheumatoid Arthritis. **Free Radic Res** 2012.

- LAURINDO, I. M. M. et al. Artrite Reumatoide: Diagnóstico e Tratamento. **Rev Bras Reumatol**, v.44, n.6, p.435-42, 2004.
- LIANG, X. et al. Advanced oxidation protein products as prognostic biomarkers for recovery from acute kidney injury after coronary artery bypass grafting. **Biomarkers**, n.17, v.6, p. 507–512, 2012.
- MARQUES NETO, J. F. et al. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatoide do adulto em amostras da população brasileira. **Rev Bras Reum**, v.33, n.5, p.169-73, 1993.
- MERRY, P. et al. Oxygen free radicals, inflammation, and synovitis: the current status. **Ann Rheum Dis**, v.48, p.864-870, 1989.
- MIRIOVSKY, B. J. et al. Anti-CCP antibody and rheumatoid factor concentrations predict greater disease activity in men with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, p.1292–1297, 2010.
- MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **J Pathol**, v.181, n.3, p.257-66, 1997.
- OZKAN, Y. et al. Oxidative status in rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**, v. 26, n.1, p. 64-8, 2007.
- PANDEY, K. B.; MISHRA, N.; RIZVI, S. I. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. **Clinical Biochemistry**, v.43, p.508-511, 2010.
- PEREIRA, I. A. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia sobre o manejo de comorbidades em pacientes com artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v.52, n.4, p.474-495, 2012.
- PERSSELIN, J. E. Diagnosis of rheumatoid arthritis. Medical and laboratory aspects. **Clin Orthop Relat Res**, n. 265, p.73-82, 1991.
- PIWOWAR, A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. **Pol Merkur Lekarski**, v. 28, n.164, p.166-9, 2010.
- PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. AOPP and its relation with selected markers of oxidative/antioxidative system in type diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v.77, p.188 –192, 2007.



POPE, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.7, p.527-35, 2002.

RINDFLEISCH, J. A.; MULLER, D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. **Am Fam Physician**, v.72, n.6, p.1037-47, 2005.

ROY, D. et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. **Heart**, v.92, p.113–114, 2006.

SARAUX, A. et al. Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. **Arthritis Rheum**, v.44,n.11, p.2485-91, 2001.

SBAROUNI, E. et al. Ischemia Modified Albumin: Is This Marker of Ischemia Ready for Prime Time Use? **HJC**,v.49, p. 260-266, 2008.

SBAROUNI, E.; GEORGIADOU, P.; VOUDRIS, V. Ischemia modified albumin changes – review and clinical implications. **Clin Chem Lab Med**, v.49, n.2, p.177–184, 2011.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quim. Nova**, v.34, n.2, p.300-305, 2011.

SINHA, M. K. et al. Ischemia Modified Albumin Is a Sensitive Marker of Myocardial Ischemia After Percutaneous Coronary Intervention. **Circulation**, v.107, p.2403-2405, 2003.

ŠKVAŘILOVÁ, M. et al. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. **Biomed Papers**,v.149, n.1, p.83-87, 2005.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Drug Discov**, v.2, n.6, p.473-88, 2003.

STREETZ, K. L. et al. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. **Cell Mol Biol**, v.47, n.4, p.661-73, 2001.

SUKKAR, S. G.; ROSSI, E. Oxidative stress and nutritional prevention in autoimmune rheumatic diseases. **Autoimmun Rev**, v.3, p.199–206, 2004.

SWEENEY, S. E.; FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.3, p.372-8, 2004.

TASLIYURT, T. et al. Frequency of antibodies against cyclic citrullinated peptides and rheumatoid factor in healthy population: a field study of rheumatoid arthritis from northern turkey. **Rheumatol Int**. 2012.

TESAROVA, P. et al. Carbonyl and oxidative stress in patients with breast cancer—is there a relation to the stage of the disease? **Neoplasma**, v.54, p.219 –224, 2007.

TORIGOE, D. Y.; LAURINDO, I. M. M. Artrite Reumatóide e Doenças Cardiovasculares [Rheumatoid Arthritis and Cardiovascular Disease]. **Rev Bras Reumatol**, v.46, supl.1, p. 60-66, 2006.

TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension: What Is the Clinical Significance? **Hypertension**, v.44, p.248-252, 2004.

VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. Cytokines in rheumatoid arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v.4, n.3, p.208-17, 2002.

VIANNA, H. R. et al. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas [Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines]. **J Bras Nefrol**, v.33, n.3, p.351-364, 2011.

WEI, X. F. et al. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.296, 2009.

WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Med Clin North Am**, n.81, n.1, p.29-55, 1997.

WILLEMZE, A. et al. New biomarkers in rheumatoid arthritis. **The Netherlands Journal of Medicine**, v.70, n.9, 2012.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v.49, p.1304–1313, 1996.

YILDIRIM, K. et al. Associations between acute phase reactant levels and disease activity score (DAS28) in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Clin Lab Sci*, v.34, p.423-426, 2004.

YU, D. H. et al. Over-expression of extracellular superoxide dismutase in mouse synovial tissue attenuates the inflammatory arthritis. **Exp Mol Med**, v.44, n.9, p. 529–535, 2012.

ZHOU, F. L. et al. Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. **J Biol Chem**, v.285, p.15010-15015, 2010.

## **APÊNDICES**

## **APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido**

**Título do projeto:** Avaliação dos níveis de albumina modificada pela isquemia, um novo biomarcador de estresse oxidativo, em pacientes com artrite reumatoide.

**Pesquisador responsável:** José Edson Paz da Silva

**Instituição/Departamento:** Universidade Federal de Santa Maria – UFSM/  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

**Telefone para contato:** (55) 8137 1362

**Pesquisadores participantes:** Michele Rodrigues Leitemperguer

Você está sendo convidado (a) a responder às perguntas deste questionário de forma voluntária. Antes de concordar em participar desta pesquisa e responder este questionário, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento.

Sua participação nesta pesquisa consistirá, além do preenchimento do questionário, o consentimento da sua parte para que o pesquisador possa utilizar a sobra do material coletado. Esta pesquisa pretende fazer a análise de marcadores que estão relacionados com o estresse oxidativo verificando as possíveis relações desses em portadores de artrite reumatoide (AR).

Não existe risco e desconforto além do que você vai ter para doar o seu sangue, pois a análise vai ser feita na mesma amostra coletada para os exames de rotina.

O preenchimento deste questionário não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para você. Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, sem benefício direto para você. As informações fornecidas por você terão sua privacidade garantida pelos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu \_\_\_\_\_, estou de acordo em

participar desta pesquisa, assinando este consentimento em duas vias, ficando com a posse de uma delas.

Local e data: \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Pesquisador responsável

Para quaisquer dúvidas ou esclarecimentos, contatar:

**Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM**

Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702

Cidade Universitária - Bairro Camobi

97105-900 - Santa Maria – RS

Tel.: (55)32209362 - Fax: (55)32208009

e-mail: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

## APÊNDICE B – Questionário

Nome:

Registro: número do same (protocolo):

Idade:

Sexo:

Peso:

Altura:

Patologia:

Há quanto tempo tem a doença:

Medicação utilizada:

Fumante:     Sim     Não

Hipertenso:  Sim     Não

Faz exercícios físicos:  Sim     Não

Doença associada:

Motivo da consulta:

Ambulatório que solicitou o exame:

História clínica na requisição da análise laboratorial:

## APÊNCICE C – Termo de Confidencialidade

**Título do projeto:** Avaliação dos níveis de albumina modificada pela isquemia, um novo biomarcador de estresse oxidativo, em pacientes com artrite reumatoide.

**Pesquisador responsável:** Michele Rodrigues Leitemperguer

**Instituição:** Universidade Federal de Santa Maria - UFSM.

**Telefone para contato:** (55) 8137 1362

**Local da coleta de dados:** Hospital Universitário de Santa Maria

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma. As informações serão mantidas no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas por um período de dois anos sob a responsabilidade do Prof José Edson Paz da Silva, após este período, os dados serão destruídos.

Este projeto de pesquisa foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM, com o número do CAAE- 0186.0.243.000-11.

Santa Maria, .....de .....de 200.....

.....  
Michele Rodrigues Leitemperguer