

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Dessander Garcia Faccin

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs9450278 DO
GENE NT5E (CD73) E A RESPOSTA AO METOTREXATO EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE**

Porto Alegre

2019

Dessander Garcia Faccin

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs9450278 DO
GENE NT5E (CD73) E A RESPOSTA AO METOTREXATO EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Degani Veit

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Garcia Faccin, Dessander

Investigação da associação entre o polimorfismo rs9450278 do gene NT5E (CD73) e a resposta ao metotrexato em pacientes com artrite reumatoide / Dessander Garcia Faccin. -- 2019.

73 f.

Orientador: Tiago Degani Veit.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2019.


1. Artrite reumatoide. 2. Metotrexato. 3. Adenosina. 4. Polimorfismo. 5. Ecto-5'-nucleotidase. I. Degani Veit, Tiago, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dessander Garcia Faccin

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs9450278 DO GENE NT5E (CD73) E A RESPOSTA AO METOTREXATO EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de _____. 

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claiton Viegas Brenol - UFRGS

Prof. Dr^a. José Artur Bogo Chies – UFRGS

Prof. Dr. Tiago Degani Veit - UFRGS (orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Tiago Degani Veit, pelo grande auxílio na elaboração e execução desse trabalho da melhor forma possível;

À professora Sueli Van der Sand pelo fornecimento da enzima BamHI, utilizada nos experimentos de clivagem;

Ao professor João Henrique Corrêa Kanan pelo apoio material para a execução dos experimentos;

Aos professores José Arthur Chies e Claiton Viegas Brenol pela análise crítica do trabalho;

Ao grupo de Imunogenética da UFRGS, em especial Valéria Kaminski, Bruna Kullman Leal, Joel Ellwanger e Andressa Gonçalves, pela recepção, apoio técnico, fornecimento de materiais e carinho;

Aos meus colegas de laboratório, Júlia Barcellos e Gabriela Gentil, pela amizade e companheirismo;

À minha mãe, Sindi Naira da Silva Garcia; padrasto, Airton Dal Molin; e irmãs, Andressa Garcia Flores e Sophia Garcia Dal Molin, por todo o apoio, incentivo e orações;

Aos meus amigos e colegas de turma.

RESUMO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por sinovite, inflamação crônica e comprometimento de articulações. O medicamento de primeira escolha é metotrexato (MTX), antimetabólito sintético pertencente a classe das drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs), que possui alta eficácia e baixo custo, porém com alta toxicidade em alguns pacientes. Esse medicamento eleva a produção de adenosina extracelular, de caráter anti-inflamatório, regulando a ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (NT5E), também conhecida como CD73. A fim de encontrar marcadores genéticos para predição de resposta clínica à terapia com MTX em pacientes com AR, foi realizada uma comparação entre presença de toxicidade no tratamento com MTX em pacientes com AR e do polimorfismo denominado rs9450278 no gene *NT5E*, utilizando um banco de amostras pré-estabelecido, das quais foram selecionadas 216 amostras contendo informações de toxicidade ao MTX. As amostras de DNA foram amplificadas através da técnica de PCR-RFLP e clivadas com BamHI. A leitura dos fragmentos foi realizada em gel de agarose corado com brometo de etídio. As frequências genotípicas e alélicas da região flanqueadora do SNP rs9450278 foram comparadas entre respondedores e não respondedores ao tratamento com MTX utilizando testes de distribuição qui-quadrado e teste exato de Fisher, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas das frequências genotípicas e alélicas entre os grupos, sugerindo ausência de associação entre efeitos adversos decorrentes do tratamento com MTX e o polimorfismo de *NT5E* em estudo. Foi observada uma associação entre o polimorfismo e duas manifestações extra-articulares dos pacientes, em específico vasculite ($p_{\text{corr}} = 0,004$) e pneumopatia ($p_{\text{corr}} = 0,007$). Os resultados obtidos sugerem ausência de associação entre efeitos adversos ao MTX e o genótipo do polimorfismo em *NT5E*, embora não descartem um possível envolvimento de polimorfismos nesse gene à resposta terapêutica do tratamento com MTX. A associação observada do polimorfismo com vasculite corrobora estudos anteriores que observaram associação entre polimorfismos no gene *NT5E* e doenças com comprometimento vascular, o que enseja investigações futuras do envolvimento desse gene em outras doenças autoimunes com comprometimento vascular, bem como em outros tipos de vasculopatias.

Palavras-chave: artrite reumatoide, metotrexato, ecto-5'-nucleotidase, CD73, adenosina, polimorfismo, vasculite.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by synovitis, chronic inflammation and joint impairment. The first-line medication is methotrexate (MTX), a synthetic antimetabolite drug belonging to the disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) class, which have high effectiveness and low cost, however it has high toxicity in some patients. This medication raises production of extracellular adenosine, anti-inflammatory, regulating the action of the enzyme ecto-5'-nucleotidase (NT5E), also known as CD73. In order to find genetic markers for predicting clinical response to MTX in RA patients, a comparison was performed between the presence of toxicity of MTX treatment in RA patients and the rs9450278 polymorphism in the NT5E gene using a pre-established sample bank from which 216 samples containing MTX toxicity information were selected. DNA samples were amplified by PCR-RFLP technique and cleaved with BamHI. Fragments were read on ethidium bromide stained agarose gel. The genotypic and allelic frequencies of the rs9450278 SNP flanking region were compared between responders and non-responders to MTX treatment using chi-square distribution and Fisher's exact tests, respectively. No significant differences in genotypic and allelic frequencies were observed between the groups, suggesting no association between adverse effects resulting from MTX treatment and NT5E polymorphism under study. There was an association between polymorphism and two extra-articular manifestations of patients, in specific vasculitis (pcorr = 0.004) and lung disease (pcorr = 0.007). The results suggest no association between MTX adverse effects and the NT5E polymorphism genotype, although they do not rule out a possible involvement of MTX polymorphisms in the therapeutic response of MTX treatment. The observed association of polymorphism with vasculitis corroborates previous studies that observed an association between polymorphisms in *NT5E* gene and diseases with vascular involvement, which leads to future investigations of the involvement of this gene in other autoimmune diseases with vascular involvement, as well as other types of vasculopathies.

Keywords: rheumatoid arthritis, methotrexate, ecto-5'-nucleotidase, CD73, adenosine, polymorphism, vasculitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do MTX	16
Figura 2 – Estrutura conformacional do CD73	19
Figura 3 – Posição do gene NT5E	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ADA	Adalimumabe
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleotídeo (do inglês <i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide</i>)
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
AMP	Adenosina monofosfato
AR	Artrite reumatoide
ATP	Adenosina trifosfato
AZA	Azatioprima
CIC	Ciclosporina
CLO	Cloroquina
DHFR	Dihidrofolato redutase
DMARDs	Drogas antirreumáticas modificadoras da doença (do inglês <i>disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima (do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ETA	Etanercepte
Fc	Fragmento cristalizável
FLS	Sinoviócitos tipo B (do inglês <i>fibroblast-like synoviocytes</i>)
FR	Fator reumatoide
G	Guanina
HID	Hidroxicloroquina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina

INF	Infliximabe
LEF	Leflunomida
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MEA	Manifestação extra-articular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês <i>major histocompatibility complex</i>)
MTX	Metotrexato
NT5E	Ecto-5'-nucleotidase
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RFLP	Polimorfismo de fragmento de restrição (do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (do inglês <i>receptor activator of nuclear fator kappa-B ligand</i>)
SUL	Sulfassalazina
SUS	Sistema único de saúde
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i>)
UTR	Região não traduzida (do inglês <i>untranslated region</i>)

SUMÁRIO



1 INTRODUÇÃO	12
1.1 ARTRITE REUMATOIDE	12
1.1.1 Definição, epidemiologia e diagnóstico	12
1.1.2 Fisiopatologia da AR	13
1.1.2.1 Aspectos gerais	13
1.1.2.2 Alterações fisiológicas e anatômicas	13
1.1.2.3 Alterações imunológicas.....	14
1.2 METOTREXATO	15
1.2.1 Aspectos gerais	15
1.2.2 Estrutura, propriedades moleculares e mecanismos de ação	15
1.2.3 Aplicação na Artrite Reumatoide	16
1.2.4 Efeitos adversos e toxicidade	17
1.3 ECTO-5'-NUCLEOTIDASE	18
1.3.1 Fisiologia	18
1.3.2 Estrutura molecular, bioquímica e genética	19
1.3.3 Polimorfismo na região 5' UTR do gene <i>NT5E</i>	20
1.4 JUSTIFICATIVA	21
1.5 OBJETIVOS	21
1.5.1 Objetivo geral	21
1.5.2 Objetivo específico	21
2 TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO ...	22
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	41
REFERÊNCIAS	42



1 INTRODUÇÃO

1.1 ARTRITE REUMATOIDE

1.1.1 Definição, epidemiologia e diagnóstico

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica e progressiva, que necessita de um diagnóstico rápido e de terapia constante com diversos medicamentos (GADALLAH et al., 2015). Sua prevalência é alta, acometendo cerca de 1% da população e afetando tanto homens quanto mulheres de todas as idades. Considerando pessoas mais jovens, a doença tem maior prevalência em mulheres na faixa de 25 a 45 anos e, após os 65 anos, é a doença inflamatória mais comum em ambos os gêneros, diagnosticada em 2% da população geriátrica (KOBAK; BES, 2018). Apesar de a causa para esta doença ainda não estar bem definida, existem fatores de risco que podem aumentar as chances de incidência, como genéticos, ambientais e hormonais (DERKSEN; HUIZINGA; VAN DER WOUDE, 2017). É uma doença caracterizada por períodos de relapsos e remissões, logo não é possível avaliar o controle da doença com apenas uma medição ao longo do tempo (CHEHATA et al., 2001).

Os pacientes com AR costumam ser diagnosticados em cerca de alguns meses após o início da doença. A sintomatologia inicial é leve e costuma passar despercebida pelos pacientes, que demoram para consultar um especialista. O tempo ideal para iniciar o tratamento da AR é dentro de 2 meses após o início dos sintomas (CHAN et al., 1994). O diagnóstico tardio (maior que 12 semanas após o início da doença) está associado à diminuição de 1,87 nas chances de remissão da doença sem o uso de drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) e a um grande impacto em longo prazo, levando a uma taxa de destruição das articulações 1,3 maior no prazo de 6 anos (MONTI et al., 2015; VAN DER LINDEN et al., 2010). O fato de não existirem meios de predição estabelecidos para a resposta à terapia (ALETAHA et al., 2007) torna necessária a pesquisa de novos marcadores prognósticos, a fim de detectar mecanismos de resistência intrínsecos em casos de baixa resposta à medicação.

O tratamento para AR, no período de 1979 a 1994, incluía o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), seguido pelo uso de corticoides. Ao longo dos anos, esses tratamentos entraram em desuso e deram lugar ao atual tratamento de primeira escolha, utilizando DMARDs sintéticos, como o Metotrexato (MTX) (ABREU et al., 2006). No Brasil, os medicamentos para tratamento de AR são disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde

(SUS). Como primeira escolha, é fornecido o MTX e, em caso de ausência de resposta ou em caso de toxicidade, são fornecidos Adalimumabe (ADA), Etanercepte (ETA), Infliximabe (INF), Azatioprima (AZA), Clotrisporina (CIC), Cloroquina (CLO), Hidroxicloroquina (HID), Leflunomida (LEF) e Sulfassalazina (SUL), que representam tratamentos de custo bem mais elevado (SILVA et al., 2018).

1.1.2 Fisiopatologia da AR

1.1.2.1 Aspectos gerais

A AR tem como principal mecanismo de patogenicidade a resposta inflamatória em articulações sinoviais e formação de *pannus*, o que provoca dor e perda de mobilidade (DERKSEN; HUIZINGA; VAN DER WOUDE, 2017). Ainda é incerto quais são os mecanismos que provocam essa resposta inflamatória (FAN et al., 2017). O desenvolvimento de AR é intensamente influenciado por fatores genéticos, sendo calculado em 60% a contribuição genética para o desenvolvimento de AR, principalmente associados aos alelos HLA-DRB1 (GOELDNER et al., 2011) devido à presença de peptídeos citrulinados, que possuem alta afinidade pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II associadas à AR (HILL et al., 2003). Diversos estudos mostram que a AR está associada a uma maior redução da expectativa de vida e mortalidade excessiva, sendo as causas das mortes relacionadas a problemas não articulares, com os problemas cardiovasculares representando aproximadamente 40% das mortes, seguidos de infecções e doenças renais, respiratórias e gastrointestinais (CHEHATA et al., 2001).

Atualmente, não há um método laboratorial - de imagem ou histopatológico definitivo para o diagnóstico de AR. O diagnóstico é realizado através de achados clínicos e exames complementares, que também podem ser utilizados para o controle de AR, como detecção de fator reumatoide (FR), detecção de proteína C reativa e velocidade de sedimentação. Esses testes são inespecíficos para AR e apenas podem ser utilizados como orientação (MINISTÉRIO DA SAÚDE - CONITEC, 2019).

1.1.2.2 Alterações fisiológicas e anatômicas

A principal característica da AR é a sinovite, com comprometimento simétrico das articulações pequenas e largas, em maior frequência nas mãos e pés. O caráter crônico e destrutivo da doença pode levar a limitações funcionais, com perda da capacidade de trabalho e qualidade de vida (DA MOTA et al., 2012). A AR pode se manifestar de forma bastante

variável, desde manifestações mais brandas, de menor duração, até uma poliartrite progressiva e destrutiva, associada a vasculite, arterioesclerose e outras MEAes (GOELDNER et al., 2011). As articulações mais frequentemente afetadas são as sinoviais periféricas, como metacarpo e metatarso falangeanas, tornozelos e punhos. No entanto, também pode haver comprometimento de joelhos, ombros, cotovelos e quadris. Articulações como a temporomandibular, as articulações sinoviais da coluna e a laringe são ocasionalmente afetadas, o que pode dificultar o diagnóstico (GOELDNER et al., 2011).

1.1.2.3 Alterações imunológicas

Dentre as diversas alterações no sistema imune presentes na AR, destacam-se a elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, alterações fenotípicas nos linfócitos T e B, desenvolvimento de autoanticorpos (DERKSEN; HUIZINGA; VAN DER WOUDE, 2017), apresentação de antígenos inadequada, aumento na resposta a autoantígenos e elevação dos níveis de interleucina (IL) 6 (KOBAK; BES, 2018). A ação de linfócitos T e B autorreativos nas articulações promove sinovite, infiltração celular e destruição/remodelação óssea (GOELDNER et al., 2011). Citocinas de linfócitos T *helper* (Th17) e IL-17 são responsáveis por elevar a taxa de destruição óssea de forma direta por indução de monócitos e de forma indireta ao elevar a expressão de ligante do receptor ativador do fator nuclear *kappa* B (RANKL) em sinoviócitos tipo B (FLS) de AR (KIM et al., 2015).

O fator reumatoide representa um conjunto de autoanticorpos, principalmente do tipo imunoglobulina M (IgM), contra a região do fragmento cristalizável (Fc) da imunoglobulina G (IgG), presente em pacientes com doenças autoimunes, doenças não-autoimunes e em indivíduos saudáveis (INGEGNOLI; CASTELLI; GUALTIEROTTI, 2013). Os principais métodos de detecção desses anticorpos são técnicas automatizadas, como nefelometria, e o ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA). Apesar desses anticorpos não serem específicos e serem detectados em diversas outras doenças, eles auxiliam no controle da AR, do diagnóstico até a decisão da estratégia terapêutica (INGEGNOLI; CASTELLI; GUALTIEROTTI, 2013). Os pacientes com AR possuem sensibilidade de 60% a 90% ao FR e especificidade de 85% (NISHIMURA et al., 2007). O FR é utilizado para diferenciar a AR de outras artrites crônicas, sendo que na AR sua detecção é geralmente aumentada (GOELDNER et al., 2011).

1.2 METOTREXATO

1.2.1 Aspectos gerais

A classe de medicamentos de primeira escolha para a AR são as DMARDs. O MTX é um DMARD antimetabólito de baixo custo derivado da aminopterina, que tem como principal mecanismo de ação a inibição da dihidrofolato redutase (DHFR) e redução da biossíntese de purinas e pirimidinas. O primeiro uso da aminopterina foi reportado em 1948 pelo patologista pediátrico Sidney Farber, a fim de ser utilizada para tratamento de leucemia infantil. Foi observado que esse fármaco interferia na proliferação do tecido das articulações, o que levou a um estudo em 1951, por Gubner e colegas da sua aplicação em pacientes com AR (GUBNER; AUGUST; GINSBERG, 1951). O MTX foi desenvolvido em 1962, a partir da necessidade de facilitar a síntese de aminopterina (WEINBLATT, 2013). Sua capacidade imunossupressora deriva da diminuição da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) em linfócitos, o que impede a proliferação no tecido (CUTOLO et al., 2001).

Além de possuir ação como quimioterápico em pacientes portadores de diversos tipos de câncer, como no tratamento de leucemia linfocítica aguda, câncer pulmonar e câncer gástrico, o MTX também é utilizado, em doses menores, como medicamento em outras doenças autoimunes além da AR, como lúpus eritematoso sistêmico (LES), psoríase, esclerose sistêmica, doença de Crohn e granulomatose com poliangiite (CIPRIANI et al., 2014).

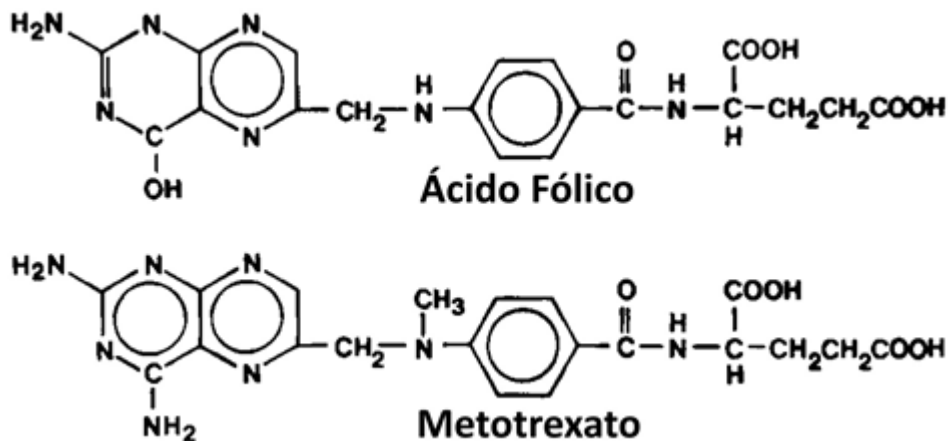
O custo da monoterapia com MTX não é elevado, porém a terapia com medicamentos anti-fator de necrose tumoral (TNF) e demais medicamentos mais novos são bem mais custosas. Em um estudo realizado por Venson e colaboradores, foram identificados os seguintes custos anuais per capita para o tratamento da AR, no ano de 2008: MTX = R\$ 183,08; INF = R\$ 25.652,84; ADA = R\$ 29.916,67; ETA = R\$ 37.055,54 (VENSON et al., 2011). Enquanto o preço comercial de uma caixa contendo 24 cápsulas orais de MTX 2,5g é em torno de 20 reais, o preço de uma caixa contendo duas ampolas de ADA 40 mg/0,8 mL, por exemplo, supera 8.000 reais.

1.2.2 Estrutura, propriedades moleculares e mecanismos de ação

O MTX (ácido 4-amino-4-deoxy-N¹⁰-metil pteroil-glutâmico), derivado do ácido L-glutâmico, possui fórmula química C₂₀H₂₂N₈O₅, é um membro das pteridinas, composto por uma amida de ácido monocarboxílico e um ácido dicarboxílico. Possui estrutura bastante similar ao ácido fólico, diferindo apenas em um grupamento amino localizado no anel de

pteridina em substituição a um grupamento hidroxila do ácido fólico e na presença de um grupamento metil na posição N¹⁰. Essa composição estrutural permite ao MTX atuar como um inibidor competitivo de diversas enzimas que utilizam folato (MILLER et al., 1986).

Figura 1. Estrutura química do MTX



(Adaptado de MILLER et al. 1986)

Os principais mecanismos de ação do MTX na inibição da proliferação celular envolvem a inibição na síntese de proteínas, DNA e ácido ribonucleico (RNA). O MTX realiza inibição competitiva da DHFR, enzima que realiza redução do dihidrofolato em tetraidrofolato, molécula responsável por inúmeras reações bioquímicas no processo de proliferação celular, incluindo a síntese de ácido ionosínico (precursor das purinas, que compõe DNA e RNA) e biossíntese do ácido timidílico, precursor do nucleosídeo timidina, que compõe o DNA (MILLER et al., 1986).

1.2.3 Aplicação na Artrite Reumatoide

A ideia do uso do MTX em pacientes com AR originou-se pela eficácia do mesmo no tratamento da psoríase, doença caracterizada por uma rápida proliferação nas células da epiderme. A eficácia no tratamento da psoríase levou a ensaios clínicos em portadores de artrite psoriática e, posteriormente, de dermatomiose, LES e AR (MILLER et al., 1986). É utilizado tanto em monoterapia quanto em combinação com outros DMARDs, como inibidores de fatores de necrose tumoral (ALETAKHA et al., 2007), o que amplia ainda mais sua eficácia (CIPRIANI et al., 2014).

É difícil relacionar os efeitos anti-inflamatórios do MTX aos efeitos antiproliferativos. Sabe-se que o MTX realiza inibição na síntese de DNA, RNA, proteínas, formação de anticorpos, respostas imunes primárias e secundárias, exsudação de células mononucleares e mediadores inflamatórios (MILLER et al., 1986), porém ainda não está elucidado se os efeitos anti-inflamatórios ocorrem pelo mesmo mecanismo de ação que os efeitos antiproliferativos (CRONSTEIN, 2010). Os mecanismos propostos para explicar os efeitos anti-inflamatórios do MTX são: 1) diminuição de espécies reativas de oxigênio, 2) inibição das reações de transmetilação requeridas pela inflamação dependentes de tetrahidrofolato e 3) aumento nos níveis de adenosina plasmática através do acúmulo intracelular do MTX, que inibe a enzima ribonucleotídeo 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) transformilase, levando ao acúmulo de AICAR intracelular e inibindo competitivamente a enzima AMP desanimase, o que leva ao acúmulo de AMP, que é liberado e convertido extracelularmente em adenosina pela ação da ecto-5'-nucleotidase (NT5E) (CRONSTEIN, 2010). Interessantemente, um estudo recente reportou que o MTX aumentou a expressão da enzima NT5E em modelos de glioblastoma multiforme, o que estaria associado a uma diminuição da frequência de linfócitos T, ao aumento na concentração extracelular de adenosina e à diminuição nas taxas de ATP extracelular (FIGUEIRÓ et al., 2016).

1.2.4 Efeitos adversos e toxicidade

O MTX é uma droga com altíssima eficácia, porém também apresenta elevada toxicidade, capaz de causar danos hepáticos e, em altas doses, pode causar graves danos renais, mielossupressão e toxicidade dermatológica (HOWARD et al., 2016). Cerca de 30% dos pacientes não respondem bem ao tratamento e aproximadamente 10 a 30% apresentam efeitos adversos, o que provoca interrupção do tratamento e exige troca de terapia, levando à perda da janela de oportunidade (BOHANEK GRABAR et al., 2008). Apesar dos problemas em termos de toxicidade, o MTX é administrado em cerca de 70% dos pacientes com AR, devido ao seu elevado custo-benefício. É necessário o estudo de biomarcadores que possam prever a resposta a esse fármaco para que seja possível evitar a ocorrência de efeitos adversos agressivos, ausência de resposta, interrupção do tratamento e perda da janela terapêutica.

Os efeitos antiproliferativos do MTX estão relacionados à estomatite, anemia, leucopenia e alopecia, que ocasionalmente acompanham o tratamento com MTX em AR ou psoríase. A hepatotoxicidade pode estar relacionada aos níveis aumentados de adenosina

mediados pelo MTX, pois a adenosina, ao interagir com receptores A_1 e A_{2B} , estimula esteatose hepática e, ao interagir com receptores A_{2A} , pode gerar fibrose hepática (CRONSTEIN, 2010).

1.3 ECTO-5'-NUCLEOTIDASE

1.3.1 Fisiologia

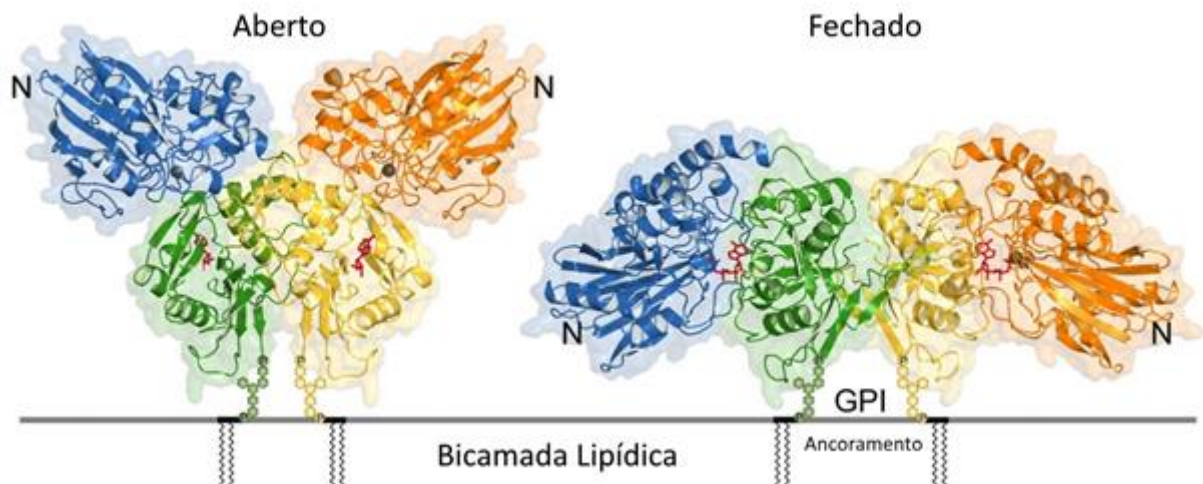
A enzima NT5E, também conhecida como CD73, é um marcador linfocitário de membrana e de exossomos que tem como papel principal a catalisação da hidrólise de AMP em adenosina na via de degradação da adenosina trifosfato (ATP), representando o maior ponto de controle dos níveis de adenosina extracelulares (KNAPP et al., 2012). É expressa em aproximadamente 70% dos linfócitos B maduros, 20% dos linfócitos T CD4+ e 50% dos linfócitos T CD8+. Anticorpos específicos anti-CD73 tendem a provocar proliferação e ativação de linfócitos T, que secretam IL-2 e expressam receptores para a IL-2, desencadeando uma resposta imune (RESTA; THOMPSON, 1997). O ATP é a principal molécula utilizada como fonte de energia intracelular e sabe-se que possui ação pró-inflamatória (CHEN et al., 2013), enquanto o AMP, produto de sua rota de hidrólise, tem ação anti-inflamatória (SALT; PALMER, 2012). A NT5E é a enzima com maior controle sobre os níveis de adenosina extracelular, sendo, portanto, alvo de diversos fármacos, como no tratamento da inflamação, dor crônica, hipóxia e câncer, porém ainda não se conhece todos os seus mecanismos e sítios de ligação (KNAPP et al., 2012).

A adenosina extracelular, juntamente com ATP e adenosina difosfato (ADP), representa a principal via de sinalização purinérgica. Essa molécula se liga aos receptores P1, acoplados à proteína G e presentes nas células do sistema inflamatório e vascular (HASKÓ; PACHER, 2008). A adenosina é produzida em resposta ao estresse metabólico e dano celular, através da liberação dos precursores da adenosina (ATP e ADP) pelas células danificadas, seguida da hidrólise desses precursores até adenosina (SALT; PALMER, 2012). Além de suprimir a atividade inflamatória de neutrófilos, macrófagos/monócitos, células dentríticas e linfócitos na patogênese da inflamação articular (CRONSTEIN, 2010), a adenosina também é importante no remodelamento e reparação teciduais (SALT; PALMER, 2012).

1.3.2 Estrutura molecular, bioquímica e genética

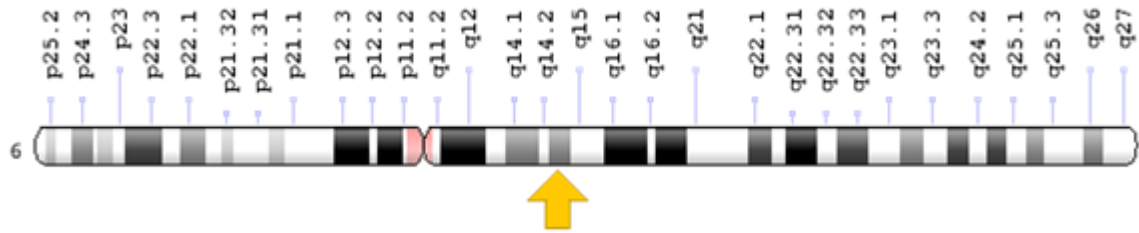
CD73 é uma proteína dimérica, composta por uma cadeia de 546 aminoácidos. Cada dímero possui dois domínios estruturais: o domínio N-terminal, que contém sítios de ligação a metais, e o domínio C-terminal, que contém sítios de ligação a substratos e a interface de dimerização. Os dois domínios são ligados por uma alfa-hélice, que fornece à enzima plasticidade para alternar entre as conformações aberta e fechada (KNAPP et al., 2012). É inibida por derivados da antraquinona, sulfonamidas e flavinoides, como a quercetina, porém ainda não se sabe como se dá esse mecanismo de inibição (KNAPP et al., 2012).

Figura 2. Estrutura conformacional do CD73.



Adaptado de KNAPP et al., 2012.

O gene NT5E localiza-se no braço longo do cromossomo 6, na posição 14.3 (6q14.3) é composto por 46.208 pares de base (MUNGALL et al., 2003). Sabe-se que polimorfismos nesse gene estão associados à calcificação das articulações e da válvula aórtica (HILAIRE et al., 2011; KOCHAN et al., 2016) e de arteriopatía urêmica calcificada em pacientes com diálise (ROTHER et al., 2017).

Figura 3. Posição do gene NT5E.

Adaptado de *Genetics Home Reference*.

1.3.3 Polimorfismo na região 5' UTR do gene *NT5E*

Foi documentado que existe uma regulação genética da expressão de CD73 através de diversos polimorfismos, com destaque para um polimorfismo na região 5' não traduzida (5' UTR) do gene *NT5E*, denominado rs9450278, que apresentou maior correlação com a expressão de CD73 em linhagens linfoblastoides humanas (LI et al., 2010). O polimorfismo em questão é uma substituição de uma guanina por uma adenina (G→A) que se encontra 1516 pb a montante do códon ATG, dentro de um sítio potencial de clivagem para a enzima de restrição BamHI. A presença do Alelo A apresentou uma correlação negativa com a expressão de *NT5E* ($R=0,376$), estando associado com menores níveis de mRNA de *NT5E* nas linhagens linfoblastoides analisadas (LI et al., 2010).

Partindo dos pressupostos de que a) o MTX não é tolerado por todos os pacientes com AR; b) a elevação na concentração de adenosina extracelular tem sido implicada tanto ao efeito terapêutico quanto à toxicidade no tratamento com MTX; c) o MTX regula o aumento da concentração de CD73, que aumenta a conversão de AMP extracelular em adenosina, de ação anti-inflamatória, e d) de que polimorfismos no gene *NT5E* possam estar associados à expressão de CD73 e à sua responsividade ao MTX, foi elaborada a hipótese de que polimorfismos no gene *NT5E* possam estar associados a mecanismos de resposta e resistência ao tratamento com MTX.

1.4 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que existem pacientes com AR que não respondem ao tratamento com MTX ou que apresentam citotoxicidade ao mesmo. Sabe-se também que não existem fatores prognósticos estabelecidos de resposta ao MTX nesses pacientes e que há necessidade de marcadores preditivos para a resposta à terapia. Esse trabalho se encaixa dentro desse contexto. A descoberta de marcadores genéticos como fatores prognósticos de resposta ao tratamento pode tornar possível o desenvolvimento de métodos de predição da resposta clínica à terapia e o planejamento de rotas alternativas de tratamento em pacientes não responsivos ou com efeitos adversos ao MTX.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Analisar a associação entre o polimorfismo rs9450278 da região 5' reguladora do gene *NT5E* e a resposta ao tratamento com MTX em pacientes com artrite reumatoide.

1.5.2 Objetivo específico

Comparar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs9450278 entre pacientes com AR que usam MTX e pacientes que abandonaram o uso de MTX por toxicidade ou irresponsividade ao tratamento.

2 TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho em preparação a ser submetido de acordo com as normas de publicação da revista *Rheumatology*.

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs9450278 DO GENE
NT5E (CD73) E A RESPOSTA AO METOTREXATO EM PACIENTES COM ARTRITE
REUMATOIDE

Dessander Garcia Faccin, Tiago Degani Veit

Título: Investigação da associação entre o polimorfismo rs9450278 do gene NT5E (CD73) e a resposta ao metotrexato em pacientes com artrite reumatoide

Autores: Dessander G. Faccin¹, Tiago D. Veit¹

Afiliação dos autores:

¹ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Autor correspondente:

Tiago Degani Veit

UFRGS - Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Rua Sarmiento Leite 500

CEP 90050170

Porto Alegre, RS, Brasil

E-mail: tiago.veit@ufrgs.br

ORCID iD: 0000-0002-7390-4583

Resumo:**Objetivos:**

A fim de encontrar marcadores genéticos para predição de resposta clínica à terapia com MTX em pacientes com AR, foi realizada uma comparação entre presença de toxicidade no tratamento com MTX em pacientes com AR e do polimorfismo rs9450278 no gene *NT5E*, utilizando um banco de amostras pré-estabelecido, dos qual foram selecionadas 216 amostras contendo informações de toxicidade ao MTX.

Métodos:

As amostras de DNA foram amplificadas através da técnica de PCR-RFLP e clivadas com BamHI. A leitura dos fragmentos foi realizada em gel de agarose corado com brometo de etídio. As frequências genotípicas e alélicas da região flanqueadora do SNP rs9450278 foram comparadas entre respondedores e não respondedores ao tratamento com MTX utilizando testes de distribuição qui-quadrado e teste exato de Fisher, respectivamente.

Resultados:

Não foram observadas diferenças significativas das frequências genotípicas e alélicas entre os grupos, sugerindo ausência de associação entre efeitos adversos decorrentes do tratamento com MTX e o polimorfismo de *NT5E* em estudo. Foi observada uma associação entre o polimorfismo e duas manifestações extra-articulares dos pacientes, em específico vasculite ($p_{\text{corr}} = 0,004$) e pneumopatia ($p_{\text{corr}} = 0,007$).

Conclusão:

Os resultados obtidos sugerem ausência de associação entre efeitos adversos ao MTX e o genótipo do polimorfismo em *NT5E*, embora não descartem um possível envolvimento de polimorfismos nesse gene à resposta terapêutica do tratamento com MTX. A associação observada do polimorfismo com vasculite corrobora estudos anteriores que observaram associação entre polimorfismos no gene *NT5E* e doenças com comprometimento vascular, o que enseja investigações futuras do envolvimento desse gene em outras doenças autoimunes com comprometimento vascular, bem como em outros tipos de vasculopatias.

Palavras-chave: artrite reumatoide, metotrexato, ecto-5'-nucleotidase, CD73, adenosina, polimorfismo, vasculite.

Mensagens-chave:

- O polimorfismo no gene *NT5E* não parece estar relacionado à citotoxicidade ao MTX em AR.
- Foram observados indícios de associação do polimorfismo em estudo à manifestações extra-articulares, como vasculite e pneumopatias.
- Os resultados não descartam uma possível associação entre polimorfismos em *NT5E* e a eficácia no tratamento com MTX.

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica e progressiva, que necessita de um diagnóstico rápido e de terapia constante com diversos medicamentos [1]. Tem como principal mecanismo de patogenicidade a resposta inflamatória em articulações sinoviais, o que provoca dor e perda de mobilidade. Caracteriza-se também por diversas alterações no sistema imune, incluindo elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, alterações fenotípicas nos linfócitos T, desenvolvimento de autoanticorpos [2], apresentação de antígenos inadequada, aumento na resposta a autoantígenos e elevação dos níveis de interleucina (IL) 6 [3]. Apesar da causa desta doença ainda não estar bem definida, existem fatores de risco que podem aumentar as chances de incidência, como genéticos, ambientais e hormonais [2].

Os pacientes com AR costumam ser diagnosticados em cerca de alguns meses após o início da doença. A sintomatologia inicial é leve e costuma passar despercebida pelos pacientes, que demoram para consultar um especialista. O tempo ideal para iniciar o tratamento da AR é dentro de 2 meses após o início dos sintomas [4]. O diagnóstico tardio (maior que 12 semanas após o início da doença) está associado à diminuição de 1,87 das chances de remissão da doença sem o uso de drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) e a um grande impacto em longo prazo, levando a uma taxa de destruição das articulações 1,3 maior no prazo de 6 anos [5,6]. O fato de não existirem meios de predição estabelecidos para a resposta à terapia [7] torna necessária a pesquisa de novos marcadores prognósticos, a fim de detectar mecanismos de resistência intrínsecos em casos de baixa resposta à medicação. A classe de medicamentos de primeira escolha para a AR são as DMARDs. O metotrexato (MTX) é um DMARD antimetabólito derivado da aminopterina, que tem como principal mecanismo de ação a inibição da dihidrofolato redutase (DHFR) e redução da biossíntese de purinas e pirimidinas [8]. O MTX foi desenvolvido em 1962 a partir

da necessidade de facilitar a síntese de aminopterina [9]. Sua capacidade imunossupressora deriva da diminuição da síntese de DNA em linfócitos, o que impede a proliferação no tecido [10]. Além de possuir ação como quimioterápico em pacientes portadores de diversos tipos de câncer, como no tratamento de leucemia linfocítica aguda, câncer pulmonar e câncer gástrico, o MTX também é utilizado, em doses menores, como medicamento em outras doenças autoimunes além da AR, como lúpus eritematoso sistêmico (LES), psoríase, esclerose sistêmica, doença de Crohn e granulomatose com poliangiite [11].

O MTX é uma droga com alta toxicidade, capaz de causar danos hepáticos e, em altas doses, pode causar graves danos renais, mielossupressão e toxicidade dermatológica [12]. Cerca de 30% dos pacientes não respondem bem ao tratamento e aproximadamente 10 a 30% dos pacientes apresentam efeitos adversos, o que provoca interrupção do tratamento e exige troca de terapia, levando à perda da janela de oportunidade [13]. Apesar dos problemas em termos de toxicidade, o MTX é administrado em cerca de 70% dos pacientes com AR, devido ao seu elevado custo-benefício. É utilizado tanto em monoterapia quanto em combinação com outros DMARDs, como inibidores de fatores de necrose tumoral [7], o que amplia ainda mais sua eficácia [11]. É necessário o estudo de biomarcadores que possam prever a resposta a esse fármaco, para que seja possível evitar a ocorrência de efeitos adversos agressivos, ausência de resposta, interrupção do tratamento e perda da janela terapêutica.

A enzima ecto-5'-nucleotidase, também conhecida como CD73, é um marcador linfocitário de membrana que tem como papel principal a conversão de adenosina monofosfato (AMP) em adenosina na via de degradação da adenosina trifosfato (ATP). É expressa em aproximadamente 70% dos linfócitos B maduros, 20% dos linfócitos T CD4+ e 50% dos linfócitos T CD8+. Anticorpos para essa enzima tendem a provocar proliferação e ativação de linfócitos T, que secretam IL-2 e expressam receptores para a IL-2, desencadeando uma resposta imune [14].

Foi documentado recentemente que o MTX tem capacidade de regular a enzima CD73 em modelos de glioblastoma multiforme, o que causaria diminuição da frequência de linfócitos T, aumento na concentração extracelular de adenosina e diminuição nas taxas de ATP extracelular [15]. Foi documentado também que existe uma regulação genética da expressão de CD73 através de diversos polimorfismos, com destaque para um polimorfismo específico na região flanqueadora do gene NT5E denominado rs9450278, que apresentou maior correlação com a expressão de CD73 em linhagens linfoblastoides [16]. Partindo dos pressupostos de que *a)* o MTX não é tolerado por todos os pacientes de AR; *b)* a elevação na concentração de adenosina extracelular tem sido implicada tanto ao efeito terapêutico quanto à toxicidade no tratamento com MTX; *c)* o MTX regula o aumento da concentração de CD73, que aumenta a conversão de AMP extracelular em adenosina, de ação anti-inflamatória, e *d)* de que polimorfismos no gene NT5E possam estar associados à expressão de CD73 e à sua responsividade ao MTX, foi elaborada a hipótese de que polimorfismos no gene NT5E possam estar associados a mecanismos de resposta e resistência ao tratamento com MTX. Dentre desse contexto, o objetivo do trabalho é analisar a associação entre o polimorfismo rs9450278 da região 5' reguladora do gene *NT5E* e a resposta ao tratamento com MTX em pacientes com artrite reumatoide.

Métodos

Amostras de DNA

As amostras de DNA foram adquiridas de um biorrepositório já estabelecido de pacientes com AR. Foram selecionados 216 pacientes do banco cuja informação sobre o uso de MTX estava disponível.

Amplificação gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clivagem com BamHI

Foram realizadas amplificações da região gênica 5' UTR do gene *NT5E* através da técnica de reação em cadeia da polimerase com polimorfismo de comprimento de fragmento

de restrição (PCR-RFLP), utilizando primers específicos para a região flanqueadora do SNP rs9450278 [16]. A sequência de primers utilizada foi, de 5' para 3', GACAAAGGGAATGTGTGAGGA e TAATGTCATGCTTTGCAAGGTT para os *primers forward* e *reverse*, respectivamente [16]. Para a reação, 100 ng de DNA genômico foi amplificado em uma reação de 25 µL com concentrações finais de tampão de PCR 1x, 2 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada *primer*, 0,08 mM de dNTPs e 1U de Taq polimerase. Foi utilizado para a amplificação o termociclador 2720 (Applied Biosystems), nas condições de: desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, anelamento de 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para a clivagem, foram pipetados 1 µL de tampão e 0,5 µL de enzima comercial BamHI para cada 8,5 µL de amostra pós amplificação em tubos de 0,2 mL. A reação foi executada em *overnight* por 16 horas no banho seco, a 37 °C. Após a reação de clivagem, os fragmentos foram analisados quanto ao tamanho das bandas em gel de poliacrilamida de 1,5% corado com brometo de etídeo. Foram classificados como homozigotos para o alelo G (GG) os pacientes que apresentaram apenas uma banda na altura de 825 pares de bases (pb), homozigotos para o alelo A (AA) aqueles que apresentaram duas bandas na altura de 526 e 299 pb e heterozigotos (AG) aqueles que apresentaram três bandas, em 825, 526 e 299 pb.

Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas da região flanqueadora do SNP rs9450278 foram comparadas entre respondedores e não respondedores ao tratamento com MTX utilizando testes de distribuição qui-quadrado e teste exato de Fisher, respectivamente. A correção de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicada em resultados cujo valor p se mostrou significativo. O nível de significância considerado para esse estudo foi de 0,05. Para os cálculos acima citados, foi usado o programa winPEPI, para Windows [17] e PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Hong Kong, HK).

Resultados

Relação entre a presença de efeitos adversos ao MTX e genótipo dos pacientes

Foram analisados os genótipos para o polimorfismo rs9450278 de 216 pacientes (177 mulheres e 39 homens) de AR que utilizam ou utilizaram MTX e apresentavam informação quanto a presença ou ausência de reação ao medicamento. A média de idade dos pacientes foi de 59,9 anos e a média de idade de diagnóstico foi de 45,2 anos. Os demais dados da amostra analisada estão disponíveis na Tabela 1.

Dos pacientes analisados, 41 (19%) apresentaram reações adversas ao medicamento. Dos pacientes com presença de reações adversas ao MTX, 20 apresentaram reações gastrointestinais, 4 apresentaram anemia ou problemas hematológicos, 3 apresentaram problemas cutâneos, 3 apresentaram problemas hepáticos, 3 pacientes apresentaram alopecia e um paciente apresentou pneumonite; 9 pacientes apresentaram toxicidade não especificada no prontuário.

Ambos os grupos de pacientes com presença e ausência de toxicidade apresentaram frequências genótípicas condizentes com equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não exibidos). Não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas e genótípicas entre os grupos apresentando ou não toxicidade ao MTX e o polimorfismo em estudo (Tabela 2). As frequências alélicas observadas para o alelo A em ambos os grupos (0,143 e 0,155, respectivamente) foram muito semelhantes àquelas documentadas no trabalho de Li *et al.* em uma população caucasóide estadunidense (0,137) [16]. As frequências genótípicas também se apresentaram bastante semelhantes entre os grupos (tabela 2). Não foi observada associação entre o tipo de reação adversa e os genótipos dos pacientes para o polimorfismo em estudo (dados não exibidos).

Relação entre manifestações extra-articulares e genótipo dos pacientes

Foi investigada a relação entre o polimorfismo e diferentes manifestações extra-articulares (MEA) associadas à AR (tabela 3). Os dados gerais sobre MEA em relação ao polimorfismo podem ser encontrados na Tabela 3. Interessantemente, os dois pacientes que apresentaram vasculite apresentaram o alelo A, sendo um homozigoto e outro heterozigoto ($p_{\text{corr}} = 0,004$). Além disso, foram observado um valor p significativo para pneumopatia ($p_{\text{corr}} = 0,007$). Não foram observados resultados significativos para as demais MEA. Também não foram observadas diferenças significativas com respeito à presença ou ausência de fator reumatoide e o polimorfismo em questão (dados não exibidos).

Discussão

No presente estudo, foi analisada a associação entre o genótipo para o polimorfismo rs9450278 de NT5E e a presença ou ausência de reações adversas ao MTX em pacientes com AR. A literatura é escassa nesse campo, sendo poucos os polimorfismos que estão associados com a responsividade ou toxicidade ao tratamento com MTX e que podem influenciar na tomada de decisões. Dentre esses polimorfismos, destacam-se: *MTHFR* rs1801133, *SLC19A1* rs1051266 e *TYMS* rs34743033 [20]. Conforme mostrado na seção Resultados, as frequências alélicas e genótípicas de ambos os grupos apresentaram uma grande semelhança, sugerindo ausência de associação entre os efeitos adversos decorrentes do uso do MTX e o polimorfismo rs9450278 em estudo.

O presente estudo foi motivado pela associação entre o polimorfismo rs9450278 e os níveis de NT5E relatados pelo estudo de Li *et al.*, o que na nossa visão poderia influenciar os níveis de adenosina em pacientes com AR sob o tratamento com MTX, já que o medicamento parece aumentar a expressão de NT5E [15]. No entanto, também é verdade que, segundo o estudo de Li *et al.*, o polimorfismo explica cerca de 12% da variação na expressão de NT5E

que foi observada entre linhagens linfoblastoides humanas [16], o que pode se tratar de um efeito muito pequeno para impactar em um desfecho clínico de toxicidade farmacológica. Cabe também salientar que não se sabe sobre a associação desse polimorfismo com níveis proteicos ou com a atividade da enzima CD73; apenas sabe-se que o polimorfismo provoca redução na expressão do mRNA de NT5E. É, portanto, possível que outros polimorfismos dentro do gene possam ter um efeito mais expressivo na modulação ao efeito terapêutico ou da citotoxicidade ao MTX.

Ao analisar o polimorfismo em relação às MEA, foi possível perceber a presença de associação com vasculite. Interessantemente, polimorfismos no gene NT5E já foram previamente associados a patologias de ordem vascular, como calcificação da válvula aórtica [18] e arteriopatía urêmica [19]. Particularmente, o estudo de Kochan *et al.* observou associação entre doenças cardiovasculares e polimorfismos no éxon 6 do gene NT5E [18]. Essa associação deve-se a importância do CD73 na regulação dos níveis de adenosina plasmática, molécula essencial para proteção e regeneração celular em situações de dano vascular, neuronal e de múltiplos outros órgãos [21]. Alterações nos níveis ou atividade de CD73 provocam calcificação arterial, aumento na inflamação e perda de proteção cardiovascular, o que aumenta a suscetibilidade para o infarto do miocárdio e falha cardíaca [21]. Esses dados ensejam estudos futuros em busca de novos marcadores genéticos para predição do desenvolvimento de vasculopatias. Além de vasculite, foi observada uma associação do polimorfismo rs9450278 a pneumopatias, mas, além do número baixo de casos (3), não existem registros de estudos prévios associando polimorfismos em NT5E e quaisquer alterações pulmonares. Assim, deve-se considerar com cautela a plausibilidade de uma associação entre pneumopatia com o polimorfismo em estudo. Cabe salientar o fato de ter sido observada associação entre o polimorfismo e MEA não implica que haja relação causal entre o polimorfismo em estudo e as manifestações acima citadas ou mesmo que a associação

observada reflita uma associação real, dado o exíguo número de pacientes, e que são necessários estudos mais detalhados e com um n maior para confirmar esses achados.

O trabalho apresentou limitações importantes, sendo a principal delas o número reduzido de indivíduos envolvidos no estudo, o que pode ter mascarado potenciais associações com desfechos clínicos. Outra limitação está associada ao fato de que o banco de dados foi elaborado a partir de dados secundários de pacientes que careciam de informações mais detalhadas, como dados sobre interrupção do tratamento, magnitude dos efeitos adversos, duração do tratamento com MTX e efetividade da medicação, o que limitou as informações quanto à resposta ao MTX. Finalmente, não foi possível, com as informações disponíveis, avaliar uma possível associação do polimorfismo com efeito terapêutico, o que demandaria o registro de atividade da doença desde o início do tratamento com DMARD. Devido a essas limitações, os resultados aqui apresentados devem ser interpretados com cautela. No entanto, o fato de que a associação observada entre o polimorfismo e vasculite encontra embasamento na literatura encoraja a investigação desse e de outros polimorfismos no gene NT5E em uma coorte mais ampla de pacientes AR com vasculite, bem como em coortes de pacientes com outras vasculopatias ou vasculites decorrentes de diferentes patologias autoimunes.

Conclusão

Em suma, foi avaliada a associação entre o polimorfismo rs9450278 do gene NT5E. Os resultados obtidos sugerem ausência de associação entre o polimorfismo em questão e a citotoxicidade ao MTX em pacientes com AR, no entanto os resultados obtidos não descartam um possível envolvimento de polimorfismos no gene NT5E à resposta terapêutica ao MTX. Além disso, a associação observada do polimorfismo com vasculite corrobora estudos

anteriores, o que enseja investigações futuras do envolvimento desse gene em outras doenças autoimunes com comprometimento vascular, bem como em outros tipos de vasculopatias.

Financiamento

Não foi recebido nenhum fundo específico de quaisquer órgãos em setores público, comerciais ou não-lucrativos para executar o trabalho descrito nesse artigo.

Agradecimentos

À professora Sueli Van der Sand pelo fornecimento da enzima BamHI, utilizada nos experimentos de clivagem.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não houve quaisquer conflitos de interesse na execução do trabalho descrito nesse artigo.

Considerações éticas

O projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP-UFRGS) e foi iniciado somente após a aprovação do mesmo.

Referências

1. Gadallah MA, Boulos DNK, Gebrel A, Dewedar S, Morisky DE. Assessment of rheumatoid arthritis patients' adherence to treatment. *Am J Med Sci*. 2015 Feb;349(2):151–6.
2. Derksen VF a. M, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):437–46.
3. Kobak S, Bes C. An autumn tale: geriatric rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2018 Jan;10(1):3–11.
4. Chan KW, Felson DT, Yood RA, Walker AM. The lag time between onset of symptoms and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994 Jun;37(6):814–20.
5. van der Linden MPM, le Cessie S, Raza K, van der Woude D, Knevel R, Huizinga TWJ, et al. Long-term impact of delay in assessment of patients with early arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Dec;62(12):3537–46.
6. Monti S, Montecucco C, Bugatti S, Caporali R. Rheumatoid arthritis treatment: the earlier the better to prevent joint damage. *RMD Open*. 2015;1(Suppl 1):e000057.
7. Aletaha D, Funovits J, Keystone EC, Smolen JS. Disease activity early in the course of treatment predicts response to therapy after one year in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*. 2007 Oct;56(10):3226–35.
8. Gubner R, August S, Ginsberg V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am J Med Sci*. 1951 Feb;221(2):176–82.
9. Weinblatt ME. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2013;124:16–25.
10. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriolo B, Straub RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2001 Aug;60(8):729–35.

11. Cipriani P, Ruscitti P, Carubbi F, Liakouli V, Giacomelli R. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Nov;10(11):1519–30.
12. Howard SC, McCormick J, Pui C-H, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist*. 2016;21(12):1471–82.
13. Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Nov;64(11):1057–68.
14. Resta R, Thompson LF. T cell signalling through CD73. *Cell Signal*. 1997 Feb;9(2):131–9.
15. Figueiró F, de Oliveira CP, Bergamin LS, Rockenbach L, Mendes FB, Jandrey EHF, et al. Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. *Purinergic Signal*. 2016;12(2):303–12.
16. Li F, Fridley BL, Matimba A, Kalari KR, Pelleymounter L, Moon I, et al. Ecto-5'-nucleotidase and thiopurine cellular circulation: association with cytotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2010 Dec;38(12):2329–38.
17. Abramson JH. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov*. 2011 Feb 2;8(1):1.
18. Kochan Z, Karbowska J, Gogga P, Kutryb-Zajac B, Slominska EM, Smolenski RT. Polymorphism in exon 6 of the human NT5E gene is associated with aortic valve calcification. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2016 Dec;35(10-12):726-731.
19. Rothe H, Brandenburg V, Haun M, Kollerits B, Kronenberg F, Ketteler M, et al. Ecto-5'-nucleotidase CD73 (NT5E), Vitamin D receptor and FGF23 gene polymorphisms may play a role in the development of calcific uremic arteriolopathy in dialysis patients - Data from the German Calciphylaxis Registry. *PLoS One*. 2017 Feb 17;12(2):e0172407.

20. Giletti A, Esperon P. Genetic markers in methotrexate treatments. *Pharmacogenomics Journal*. 2018 Dec;18(6):689-703.
21. Minor M, Alcedo KP, Battaglia RA, Snider NT. Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Am J Physiol Physiol*. 2019 Dec 1;317(6):C1079-C1092.

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com AR.

Características dos pacientes	n (216)	%	Médias	DP
Mulheres	177	81.9		
Homens	39	18.1		
Etnia				
Causasianos	213	98.6		
Africanos	2	0.9		
Asiáticos	1	0.5		
Idade (anos)			59.9	12.316
Idade de DX (anos)			45.2	13.607
Positividade para FR	182	84.3		
Erosões	189	87.5		
Manifestações EA	59	27.5		
Nódulos reumatoides	49	22.7		
Vasculite	2	0.9		
Síndrome de Felty	1	0.5		
Amiloidose	3	1.4		
Episclerite	8	3.7		
Pneumopatia	2	0.9		
Subluxações	25	11.6		
Toxicidade ao MTX	41	19.0		

AR, Artrite Reumatoide; DP, Desvio Padrão; DX, Diagnóstico; EA, Extra Articular; FR, Fator Reumatoide.

Tabela 2. Genótipo do polimorfismo rs9450278; frequências alélicas e haplotípicas em pacientes que apresentaram e não apresentaram toxicidade ao MTX.

Genótipo	Toxicidade n (frequência)	Não toxicidade n (frequência)
GG	31 (0.738)	126 (0.724)
AG	10 (0.238)	42 (0.241)
AA	1 (0.024)	6 (0.034)
Valor P	0.937*	
G	72 (0.857)	294 (0.845)
A	12 (0.143)	54 (0.155)
Valor P	0.867**	

*Qui-quadrado de Pearson

**Teste exato de Fischer

Tabela 3. RA – Manifestações clínicas gerais em diferentes genótipos para o polimorfismo rs9450278.

Manifestação		Genótipo			n	p*	p _{corr} **
		GG	AG	AA			
Erosões	Sim	139 (0.735)	45 (0.238)	5 (0.026)	189	0.258	
	Não	15 (0.625)	7 (0.292)	2 (0.083)	24		
MEA	Sim	42 (0.712)	13 (0.22)	4 (0.068)	59	0.194	
	Não	114 (0.731)	39 (0.25)	3 (0.019)	156		
NR	Sim	36 (0.735)	10 (0.204)	3 (0.061)	49	0.371	
	Não	120 (0.723)	42 (0.253)	4 (0.024)	166		
Vasculite	Sim	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	2	<0.001	0.004
	Não	156 (0.732)	51 (0.239)	6 (0.028)	213		
Felty	Sim	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	0.827	
	Não	155 (0.724)	52 (0.243)	7 (0.033)	214		
Amiloidose	Sim	2 (0.667)	0 (0.0)	1 (0.333)	3	0.010	0.100
	Não	154 (0.726)	52 (0.245)	6 (0.028)	212		
Episclerite	Sim	5 (0.625)	3 (0.375)	0 (0.0)	8	0.608	
	Não	151 (0.729)	49 (0.237)	7 (0.034)	207		
Pneumopatia	Sim	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	2	<0.001	0.007
	Não	155 (0.728)	52 (0.244)	6 (0.028)	213		
Subluxações	Sim	20 (0.8)	3 (0.12)	2 (0.08)	25	0.142	
	Não	136 (0.716)	49 (0.258)	5 (0.026)	190		

MEA, Manifestações Extra Articulares; NR, Nódulos Reumatoides.

*Qui-quadrado de Pearson

**n=9

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A artrite reumatoide é uma doença de caráter crônico, caracterizada por períodos de relapsos e remissões. Isso torna necessário o acompanhamento dos pacientes em diferentes períodos de tempo, para que sejam obtidos dados mais fiéis à condição. O polimorfismo rs9450278 não apresentou relação com efeitos de toxicidade ao MTX, porém isso não descarta a hipótese de que possam existir polimorfismos no gene NT5E associados a responsividade ao tratamento.

Estudos futuros devem abranger, além de um maior número de polimorfismos, um n amostral mais amplo. A associação observada do polimorfismo com vasculite corrobora estudos anteriores, o que enseja investigações futuras do envolvimento desse gene em outras doenças autoimunes com comprometimento vascular, bem como em outros tipos de vasculopatias.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. DE et al. Evaluation of the sociodemographic, clinical-laboratorial and therapeutic profile of rheumatoid arthritis patients who participated of research projects in the Escola Paulista de Medicina in the last 25 years. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 2, p. 103–109, abr. 2006.
- ALETAHA, D. et al. Disease activity early in the course of treatment predicts response to therapy after one year in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 10, p. 3226–3235, out. 2007.
- BOHANEK GRABAR, P. et al. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1057–1068, nov. 2008.
- CHAN, K. W. et al. The lag time between onset of symptoms and diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 37, n. 6, p. 814–820, jun. 1994.
- CHEHATA, J. C. et al. Mortality in rheumatoid arthritis: relationship to single and composite measures of disease activity. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 40, n. 4, p. 447–452, abr. 2001.
- CHEN, K. et al. ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 5, p. 932–943, maio 2013.
- CIPRIANI, P. et al. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, n. 11, p. 1519–1530, nov. 2014.
- CRONSTEIN, B. How does methotrexate suppress inflammation? **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 28, n. 5, s. 61, p. 21–23, oct. 2010.
- CUTOLO, M. et al. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 60, n. 8, p. 729–735, ago. 2001.
- DA MOTA, L. M. H. et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira De Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 152–174, abr. 2012.
- DERKSEN, V. F. A. M.; HUIZINGA, T. W. J.; VAN DER WOUDE, D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 4, p. 437–446, 2017.
- FAN, W. et al. Identification of CD4+ T-cell-derived CD161+ CD39+ and CD39+CD73+ microparticles as new biomarkers for rheumatoid arthritis. **Biomarkers in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 107–116, fev. 2017.
- FIGUEIRÓ, F. et al. Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. **Purinergic Signalling**, v. 12, n. 2, p. 303–312, 2016.

GADALLAH, M. A. et al. Assessment of rheumatoid arthritis patients' adherence to treatment. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 349, n. 2, p. 151–156, fev. 2015.

GOELDNER, I. et al. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 495–503, out. 2011.

GUBNER, R.; AUGUST, S.; GINSBERG, V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 221, n. 2, p. 176–182, fev. 1951.

HASKÓ, G.; PACHER, P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 3, p. 447–455, mar. 2008.

HILL, J. A. et al. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 171, n. 2, p. 538–541, 15 jul. 2003.

HOWARD, S. C. et al. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. **The Oncologist**, v. 21, n. 12, p. 1471–1482, 2016.

INGEGNOLI, F.; CASTELLI, R.; GUALTIEROTTI, R. Rheumatoid factors: clinical applications. **Disease Markers**, v. 35, n. 6, p. 727–734, 2013.

KIM, K. W. et al. Th17 cytokines regulate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 11, p. 3011–3024, nov. 2015.

KNAPP, K. et al. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. **Structure (London, England: 1993)**, v. 20, n. 12, p. 2161–2173, 5 dez. 2012.

KOBAK, S.; BES, C. An autumn tale: geriatric rheumatoid arthritis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 10, n. 1, p. 3–11, jan. 2018.

LI, F. et al. Ecto-5'-nucleotidase and thiopurine cellular circulation: association with cytotoxicity. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 38, n. 12, p. 2329–2338, dez. 2010.

MILLER, D. R. et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update. **Pharmacotherapy**, v. 6, n. 4, p. 170–178, ago. 1986.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - CONITEC. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para artrite reumatóide**, 2019. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2019/Relatorio_PCDT_Artrite_Reumatoide_CP21_2019.pdf>

MONTI, S. et al. Rheumatoid arthritis treatment: the earlier the better to prevent joint damage. **RMD open**, v. 1, n. Suppl 1, p. e000057, 2015.

MUNGALL, A. J. et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 805–811, 23 out. 2003.

NISHIMURA, K. et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. **Annals of Internal Medicine**, v. 146, n. 11, p. 797–808, 5 jun. 2007.

RESTA, R.; THOMPSON, L. F. T cell signalling through CD73. **Cellular Signalling**, v. 9, n. 2, p. 131–139, fev. 1997.

SALT, I. P.; PALMER, T. M. Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 8, p. 1155–1167, ago. 2012.

SILVA, G. D. DA et al. Perfil de gastos com o tratamento da Artrite Reumatoide para pacientes do Sistema Único de Saúde em Minas Gerais, Brasil, de 2008 a 2013. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 4, p. 1241–1253, abr. 2018.

ST HILAIRE, C. et al. NT5E mutations and arterial calcifications. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 5, p. 432–442, 3 fev. 2011.

VAN DER LINDEN, M. P. M. et al. Long-term impact of delay in assessment of patients with early arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 12, p. 3537–3546, dez. 2010.

VENSON, R. et al. Avaliação econômica das anticitocinas adalimumabe, etanercepte e infliximabe no tratamento da artrite reumatoide no Estado do Paraná. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 21, n. 2, p. 359–376, 2011.

WEINBLATT, M. E. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 16–25, 2013.



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL / PROPEAQ ; UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da associação entre o polimorfismo rs9450278 do gene NT5E (CD73) e a resposta ao metotrexato em pacientes com artrite reumatoide

Pesquisador: TIAGO DEGANI VEIT

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 21166819.7.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.601.354

Apresentação do Projeto:

Trata-se do TCC em Biomedicina de Dessander Garcia Faccin sob a orientação de Prof. Tiago Degani Veit (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, UFRGS) e Prof. José Artur Bogo Chies (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS). A artrite reumatoide é uma doença autoimune crônica e progressiva, que necessita de um diagnóstico rápido e de terapia constante com diversos medicamentos. A classe de medicamentos de primeira escolha para a AR são as drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs). O metotrexato (MTX) é um DMARD antimetabólito derivado da aminopterina, que tem como principal mecanismo de ação a inibição da dihidrofolato redutase e redução da biossíntese de purinas e pirimidinas. Partindo dos pressupostos de que a) o MTX regula o aumento da concentração de CD73, que aumenta a conversão de ADP extracelular em adenosina, de ação anti-inflamatória, e b) de que polimorfismos no gene NT5E possam estar associados à expressão de CD73 e à sua responsividade ao MTX, foi elaborada a hipótese de que polimorfismos no gene NT5E possam estar associados a mecanismos de resposta e resistência ao tratamento com MTX.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a associação entre o polimorfismo rs9450278 da região reguladora do gene NT5E e a

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 3.601.354

resposta ao tratamento com MTX em pacientes com artrite reumatoide comparando as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs9450278 entre pacientes com AR que usam MTX e pacientes que abandonaram o uso de MTX por toxicidade ou irresponsividade ao tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos associados ao projeto são a quebra da confidencialidade dos dados dos pacientes, o que será minimizado pela utilização de tabelas sem as informações pessoais dos mesmos.

Benefícios:

Os benefícios associados ao projeto são indiretos e consistem na possível identificação de marcadores genéticos que possibilitem o melhor manejo da doença no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto utilizará amostras de DNA de 220 pacientes com AR em uso de da medicação MTX e de 75 pacientes que abandonaram o uso de MTX, perfazendo um total de 295 pacientes. O número amostral é baseado no número de pacientes do biorrepositório que possuem informação disponível sobre as medicações utilizadas no tratamento, configurando-se uma amostra de conveniência. As amostras de DNA serão adquiridas de um biorrepositório de DNA já estabelecido de pacientes com artrite reumatoide, sob a responsabilidade do Prof. José Artur Bogo Chies. O biorrepositório foi criado no projeto 01-085 do HCPA intitulado "Estudo do polimorfismo do CCR5 e análise de sua expressão fenotípica em pacientes com artrite reumatoide" e revalidado, com ampliação do mesmo com novas coletas, em projetos posteriores que incluíam análises moleculares e celulares. A solicitação de dispensa do preenchimento de novo TCLE neste estudo fundamenta-se pelos seguintes motivos: I) Serão utilizados dados associados ao biorrepositório de amostras de DNA já estabelecido, tendo os participantes já assinado o TCLE concordando com a utilização dessas amostras para "análises de genes de interesse imunológico" desde que aprovado pelo CEP; II) A análise da totalidade de dados será feita de forma anônima, sem haver quaisquer tipos de identificação nominal de seus participantes em nenhuma etapa da pesquisa; III) Trata-se de um estudo não intervencionista (com a inexistência de intervenções de cunho clínico) e incapaz de exprimir modificações/influências na rotina/tratamento do participante do estudo; IV) Os resultados alcançados serão agregadamente apresentados, não possibilitando a identificação individualizada dos participantes; e V) Não haverá

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL / PROPEAQ ; UFRGS



Continuação do Parecer: 3.601.354

obtenção de benefícios diretos ao participante que culminem em mudanças no curso de sua patologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta projeto e TCUD assinado por todos os pesquisadores.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências, projeto adequado para aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

APROVADO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1429828.pdf	17/09/2019 15:45:38		Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_TiagoVeit.pdf	17/09/2019 15:44:50	TIAGO DEGANI VEIT	Aceito
Outros	TCUD_Dessander.pdf	16/09/2019 15:28:06	TIAGO DEGANI VEIT	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_Dessander_CEP.pdf	16/09/2019 15:26:58	TIAGO DEGANI VEIT	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 26 de Setembro de 2019

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Information for Authors

1. *Rheumatology's* Aims and Scope
2. Preparing your manuscript
 - A. Article types
 - B. Authorship
 - C. Title page
 - D. References
 - E. Statements
 - F. Figures, tables and videos
 - G. Graphical abstracts
 - H. Supplementary material
 - I. Clinical trial registration and reporting guidelines
 - J. Style
3. Submitting your manuscript
4. Peer review process
 - A. Decision
 - B. Revision
 - C. Appeals/Rebuttals
5. Publishing your manuscript
 - A. Post-acceptance guidelines
 - B. Copyright and permissions
 - C. Open Access
 - D. Availability of data and materials
 - E. Promoting your research
6. Other
 - A. Misconduct

1. *Rheumatology's* Aims and Scope

Rheumatology strives to support research and discovery by publishing the highest quality original scientific papers with a focus on basic, clinical and translational research. It is an official journal of the [British Society for Rheumatology](#), and is published by Oxford University Press. The journal covers a wide range of paediatric and adult rheumatological conditions from an international perspective. Find out more about the global impact of *Rheumatology* via our [interactive infographic](#).

Rheumatology welcomes proposals from authors on novel and emerging therapies within rheumatology. We are also particularly interested in research that can be followed-up with a series of podcasts, videos and other online media. Keep up to date by following us on Twitter [@RheumJnl](#).

We publish original articles, reviews, editorials, guidelines, concise reports, meta-analyses, original case reports, clinical vignettes, letters and matters arising from published material. Please see our [Article Types](#) (section 2A) for more detailed information, including word counts.

We encourage our authors and reviewers to add their [ORCID IDs](#) to their ScholarOne Manuscripts profile, and track their research impact with [Publons](#).

Submitted manuscripts are peer reviewed in a two-stage process while aiming for rapid publication of all papers both online and in print. We also offer [Open Access](#) publishing options and support [Author Self-Archiving](#) to facilitate the wider dissemination of research.

If you are unsure as to whether your manuscript fits within our Aims and Scope, please send an abstract of no more than 250 words to editorial@rheumatology.org.uk.

[Instructions to authors - Chinese Translation](#)

[Guidelines for reviewers](#)

2. Preparing Your Manuscript

All manuscripts must contain a title page (section 2C), disclosure statement and funding statement. An ethics statement must be included if applicable. For more information on statements, please go to section 2E.

For general information on manuscript file types and formatting, please refer to the [Oxford University Press author resource centre](#).

2A. Article Types

Original Article

Original articles are based on clinical, laboratory, therapeutic and translational research.

- Title page
- Abstract (250 words, divided into Objectives, Methods, Results and Conclusion)
- Clinical trial registration number (for all RCTs)
- Keywords (up to 10 – please note that the word count refers to individual words, not phrases)
- Key messages (up to 3, maximum 15 words each)
- References (up to 50)
- Tables/figures (up to 6, not including supplementary material)
- Word count: 3,500

Systematic review and meta analysis

These are based on data from original research, and should be accompanied by a [PRISMA checklist](#). Meta analyses include the use of statistical methods.

- Title page
- Abstract (250 words, divided into Objectives, Methods, Results and Conclusion)
- Clinical trial registration number (for all RCTs)
- Keywords (up to 10 - please note that the word count refers to individual words, not phrases)
- Key messages (up to 3, maximum 15 words each)
- References (up to 150)
- Tables/figures (up to 6 not including supplementary material)
- PRISMA checklist
- Word Count: 3,500

Concise Report

Concise reports are condensed versions of original articles. They may also be case series in which a clear clinical message can be inferred.

- Title page
- Abstract (250 words, divided into Objectives, Methods, Results and Conclusion)
- Clinical trial registration number (for all RCTs)
- Keywords (up to 10 – please note that the word count refers to individual words, not phrases)
- Key messages (up to 3, maximum 15 words each)
- References (up to 20)

- Tables/figures (up to 2, not including supplementary material)
- Word count: Up to 2,000

Review

We welcome reviews, including hypothesis articles. Review articles should be of interest to physicians and clinicians working in rheumatology and should reflect the trends and progress in that field. Although these articles are usually commissioned, *Rheumatology* does consider unsolicited reviews. Please email editorial@rheumatology.org.uk a brief outline of your proposed review, along with a working title and authorship list.

- Title page
- Abstract (unstructured, 150 words)
- Keywords (up to 10 - please note that the word count refers to individual words, not phrases)
- Key messages (up to 3, maximum 15 words each)
- References (up to 150)
- Tables/figures (up to 6, not including supplementary material)
- Word Count: 4,000

Editorial

An Editorial is a short opinion piece on a relevant topic, which may comment on an article in an issue or be an independent piece on a current issue. We prefer editorials to be topical and to be supported by references. Although editorials are usually commissioned, *Rheumatology* is happy to consider unsolicited Editorials. Please write a brief summary of your proposed editorial and email it to editorial@rheumatology.org.uk.

- Title page
- Unstructured text
- References (up to 10)
- Table/figure (up to 1, not including supplementary material)
- Word count: Up to 1,000

Editorials are available as free-to-view papers in *Rheumatology* online.

Letter to the Editor (Case report)

Case Reports should be submitted in the form of a letter to the Editor. Case reports should provide novel insight into a disease, i.e. where the authors have measured or observed something novel around a mechanism or it is the first observation. Case reports from an educational point of view or a reminder of what was once known and perhaps less well known, or those that are the second or third example of a disease or a phenomenon, are less likely to be accepted. Patient consent must be obtained prior to submission, and the [author declaration form](#) must be sent with your submission to Rheumatology.

- Title page
- Unstructured text, starts with ‘Dear Editor,’
- One key message (maximum 15 words)
- References (up to 8)
- Table/figure (up to 1, not including supplementary material)
- Word Count: Up to 800
- Patient consent declaration form

Letter to the Editor (Matters arising)

Matters Arising letters in response to articles published in *Rheumatology* should be submitted within 3 months of the print publication date of the article the letter refers to. The letter will be shown to the authors of the original article, who will be offered the chance to reply. A reference to the original article must be included in the paper. Replies should reference the first matters arising letter, as well as the original article. The title of the letter should be: Comment on: TITLE OF ORIGINAL PAPER. Replies to comments should be given the title 'Comment on: TITLE OF ORIGINAL PAPER: Reply.

- Title page
- Unstructured text, starts with ‘Dear Editor,’
- One key message (maximum 15 words)
- References (up to 8)
- Table/figure (up to 1, not including supplementary material)
- Word count: Up to 800
- Reference to original paper

Letter to the Editor (Other)

Other letters are short communications on issues affecting the field of rheumatology.

- Title page
- Unstructured text, starts with ‘Dear Editor,’
- One key message (maximum 15 words)
- References (up to 8)
- Table/figure (up to 1, not including supplementary material)
- Word count: Up to 800

Clinical Vignette

Clinical Vignettes are a brief clinical report describing a unique image. All Clinical Vignettes must have patient consent, and the [author declaration form](#) must be sent with your submission to *Rheumatology*.

- Title page
- Unstructured text
- References (up to 2)
- Figure (up to 1, not including supplementary material)
- Word count: Up to 200
- Patient consent declaration form

InSight

InSight papers are novel highly visual short summary pieces of up to 2 pages highlighting key findings of research with short bullet point descriptions. These educational papers are designed for optimum visual engagement and dissemination on social media platforms. InSight papers are published online and in print. *For all InSight proposals please contact Emma Welsh, Head of Custom Content (emma.welsh@oup.com) before submitting your article.*

- Title page
- Unstructured text
- Clinical trial registration number (for all RCTs)
- Keywords (up to 10 – please note that the word count refers to individual words, not phrases)
- Key messages (up to 3, maximum 15 words each)
- References: 10 maximum
- Unlimited tables/figures/box diagrams
- Word count: Up to 500

Guideline

Guidelines are evidence-based recommendations for practitioners on treatment and diagnosis of patients. They have an executive summary published in the print and online versions of the issue, and provide a summary of the key points. The full guideline is then published online only with no word limit.

- Executive summary
- Title page
- Key words (up to 10)
- References (up to 50)
- Tables/figures (up to 6, not including supplementary material)
- Word Count: Up to 3,500

Guideline papers are available as free-to-view papers in *Rheumatology* online.

Obituary

Rheumatology prefers obituaries to be submitted within the first year of the person's death. All potential obituaries need to be first approved by the Editor before submission. For a pre-submission enquiry please e-mail editorial@rheumatology.org.uk.

- Title: Must contain the person's name
- Word Count: Up to 800

2B. Authorship

Authorship list

All individuals listed as authors should qualify for authorship according to the following four ICMJE criteria:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- Final approval of the version to be published; AND
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributors who have made substantial contributions (including writing and editing assistance, see below) but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgements section. The National Library of Medicine (NLM) indexes authors and lists the names of collaborators if listed in the Acknowledgements. PubMed rules for this can be found on the [PubMed rules](#) page.

Changes to the authorship list are not permitted after a paper has been accepted. For further information about authorship, please refer to the [ICMJE guidelines](#).

Members of the Data and Safety Monitoring Board (DSMB) (or Data Monitoring Committee [DMC]) should be independent of the trial and not be involved in the preparation of the manuscript for publication or act as an author on the paper.

Ghost writing or writing assistance

Ghost writing is when someone has made a substantial contribution to the research, writing or editing of a manuscript and this role is not mentioned in the paper. Such writers are contributors to the manuscript and, if they are not included in the authorship list, their involvement, affiliations and any funding that was provided for their assistance should be included in the acknowledgement section of the paper.

Group authorship

For studies involving a large multicentre group, a joint decision should be made to only list members who qualify for authorship and are willing to accept responsibility for the manuscript.

The involvement of a group in the authorship list should be indicated by the connector 'and', e.g.

Eric Hachulla, Patrick Carpentier, Virginie Gressin, Elisabeth Diot, Yannick Allanore, Jean Sibilia, David Launay, Luc Mouthon, Patrick Jego, Jean Cabane, Pascal de Groote, Amélie Chabrol, Isabelle Lazareth, Loïc Guillevin, Pierre Clerson, Marc Humbert, and the ItinérAIR-Sclérodermie Study Investigators

The other members of the group should be listed in the acknowledgements section of the manuscript. All authors must be aware of and agree to the submission of the manuscript to the journal. The National Library of Medicine (NLM) indexes the group name and authors and lists the names of collaborators if they have been listed in the acknowledgements. Please refer to the [PubMed rules](#) for more information.

When the study has been carried out on behalf of a group, the connector ‘for’ should be used in the authorship list, e.g.

Raashid Luqmani, Sheena Hennell, Cristina Estrach, Damian Basher, Fraser Birrell, Ailsa Bosworth, Frank Burke, Carole Callaghan, Jaime Candal-Couto, Chris Fokke, Nicola Goodson, Dawn Homer, John Jackman, Paula Jeffreson, Susan Oliver, Mike Reed, Luis Sanz, Zoe Stableford, Peter Taylor, Nick Todd, Louise Warburton, Chris Washbrook, and Mark Wilkinson for the British Society for Rheumatology and British Health Professionals in Rheumatology Standards, Guidelines and Audit Working Group

When the authorship list contains a group name but no individual names, all members of the group must qualify for authorship. The names and affiliations of group members must be listed in the acknowledgements.

2C. Title page

Your manuscript must contain a title page with the following information:

- Manuscript title (no more than 140 characters, including spaces)
- Authorship list with author names in the following format: first name, middle initial (if desired), last name (e.g. John E. Smith)
- Author affiliations in the following format: department, institution, town, state (for USA, CAN, AUS), country (e.g. Department of Academic Rheumatology, King’s College London, London, UK)
- One corresponding author, with a full postal address, e-mail address and ORCID iD provided. This information will be published if the article is accepted.

2D. References

Referencing should be in the Vancouver style, wherein references are identified in the text by Arabic numerals and numbered in the order cited. A reference list should be provided at the end of the manuscript’s main text. Complete information should be given for each reference, including the title of the article, abbreviated journal title, and page numbers. In instances where there are more than six authors, ‘et al’ should be used, otherwise all authors should be listed.

Personal communications, manuscripts in preparation, and other unpublished data should not be cited in the reference list but may be mentioned in parentheses in the text, along with the name of the person and the institution. Authors should obtain permission from the source to cite unpublished data.

Titles of journals should be abbreviated in accordance with Medline. If a journal is not listed in Medline, its name should be written out in full. The University of Manchester has good [examples](#) of Vancouver references.

Article citation examples can be seen below.

Example of a journal article:

Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou N A. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2002;41:1232-9.

When an article has been published online but is not yet assigned to an issue the digital object identifier (DOI) number should be used as in the following example:

Bastin S, Bird H, Gamble G, Cundy T. Paget's disease of bone—becoming a rarity? *Rheumatology* 2009 published on 16 July 2009. doi:10.1093/rheumatology/kep212

Example of a website:

Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Example of a book:

Mitchell SC, Waring RH. S-Oxygenase III human pharmacogenetics. In: Damani LA, ed. Sulphur-containing drugs and related organic compounds, Vol. 2B. New York: Ellis Horwood, 1989:101-19.

The accuracy and completeness of the references is the responsibility of the authors.

2E. Statements (funding, conflict of interest and ethics)

Funding statement

All manuscripts must contain a funding statement, even if no funding was received for the paper. Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

If no funding was received, the funding statement should be as follows: 'No specific funding was received from any bodies in the public, commercial or not-for-profit sectors to carry out the work described in this article.'

If funding was received, the sentence should begin: 'This work was supported by...'.

The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 sub-institutions) or 'NCI at NIH' (full RIN-approved list of UK funding agencies).

Grant numbers should be complete, accurate and provided in brackets, with a comma to separate multiple grant numbers, e.g. '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'.

Agencies should be separated by a semi-colon (plus ‘and’ before the last funding agency).

Where individuals must be specified for certain sources of funding, the following text should be added after the relevant agency or grant number: ‘to [author initials]’.

A full example of a funding statement is given here: ‘This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789].’

OUP will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Crossref funding data registry: In order to meet your funding requirements, authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the [CHORUS initiative](#), please visit the site.

Conflicts of interest

All manuscripts submitted to the Journal must contain a disclosure statement indicating any potential financial conflicts of interest that any of the authors may have. If none of the authors have any conflicts, insert a statement saying that the authors declare no conflicts of interest.

For additional information on the different types of conflict of interest, see the World Association of Medical Editors’ [\(WAME\) policy statement](#) on conflicts of interest.

Ethics

Where applicable, authors should state that their study complies with the Declaration of Helsinki, that the locally appointed ethics committee has approved the research protocol and that informed consent has been obtained from the subjects (or their legally authorized representative).

All manuscripts in which experiments on animals are reported should include a statement that the experiments were conducted with full compliance with local, national, ethical, and regulatory principles and local licensing regulations. The name of the authorizing body should be stated in the paper.

The Editorial Board reserves the right to reject papers for which the ethical aspects are, in the Board’s opinion, open to doubt.

2F. Figures, tables and videos

Figures and tables should be included at the end of the main document or uploaded as separate files. All figures and tables must be referenced in the text and numbered consecutively in the order in which they appear.

- Each figure/table must have a legend beginning with a brief title (up to 15 words)
- Titles should be included as part of the legend, not as part of the figure/table
- Legends should be a concise description of the data in the figure/table (up to 100 words each)

- All symbols, error bars and abbreviations used in the figure/table should be defined
- Common abbreviations from the standard list need not be defined, all others, including those that have been defined in the text will need to be defined in the figure/table legend
- Data should only be presented in one form, either a table or figure

Preparing your figures

Prepare your figures at print quality resolution .tif files:

- 1200 dpi [dots per inch] for line drawings
- 600 dpi for colour and half-tone artwork
- Parts of a figure should be labelled with upper case A, B, C, etc.
- Figures should not contain more than one section unless the parts are logically connected
- Scale bars should be used instead of magnification factors.
- Graphs: 3D graphs should not be used unless necessary. If using hatching, please keep it simple
- Forest plots: Please include the tabular information in the figure file with the forest plot.

If the figure files are too large to be submitted online, please email them to the Editorial Office (editorial@rheumatology.org.uk) using a free transfer service such as DropBox or WeTransfer.

For useful information on preparing your figures for publication, go to [Cadmus](#) or the [OUP guide for authors](#).

For online submission, please also prepare a second version of your figures at low-resolution (72 dpi) for use in the review process only; these figures can be saved as .jpg, .gif, .tif or .eps format.

Colour figures

Colour illustrations are accepted, but authors will be required to pay the cost of reproduction (£100/\$190/€150 per figure). Alternatively, if the colour is not crucial for the image's scientific understanding, colour can be published online only, with a black and white version in the print Journal.

Line drawings

No additional artwork, redrawing or typesetting will be done. Faint or fine-grained stippling or shading or continuous-tone shading will be lost or may appear black on reproduction. Please use a coarse stippling or hatching.

Any previously published material should have relevant written permission of the author and copyright holder for its reproduction for both print and electronic perpetuity. Please include a statement in the figure legend acknowledging the original source.

Image manipulations

Rheumatology does not allow certain electronic enhancements or manipulations of micrographs, gels, or other digital images. Figures assembled from multiple photographs or images must indicate the separate parts with the lines

between them. Any adjustments of contrast, brightness or colour must be applied to an entire image or plate equally. Selective enhancements or alterations of one part of an image are not acceptable.

When suspicions are raised regarding the authenticity of an image it is the Journal's policy to investigate. *Rheumatology* may ask authors to provide additional documentation of their primary data and/or for copies of the original figures.

Preparing your tables

- Each table should be typed on a separate sheet with an appropriate legend and footnotes explaining any abbreviations (footnotes should be indicated with an alphabetical letter a, b, c, etc.)
- Tables must be numbered in consecutive order in order of appearance in the text
- Must be in an editable format (e.g. Word file)
- Each table should have a brief, descriptive title (up to 15 words) that is self-explanatory
- Data provided in the table must be fully defined including units and a description of how the data is represented (e.g. mean (S.D.); n, %)
- All P values must be defined. Bold text can be used to highlight particular information along if an explanation is given in the footnote. Shading in tables is not allowed

Videos

Videos can now be published in the online article with a still image of the video appearing in the print version. Authors should submit videos in mp4 or avi format. Still images to be used in the article must be provided and should represent as best as possible the main subject of the video. Video files should be clearly named as video 1, video 2 etc, and still images should be named 'video 1 still image'. Any supplementary videos not published in the article should be uploaded as supplementary data. For more information about preparing videos for publication, please see our [video and media guide](#).

2G. Graphical abstracts

Authors of Original Articles, Reviews and Concise Reports are encouraged to submit a graphical abstract as part of the article, in addition to the text abstract. The graphical abstract should clearly summarize the focus and findings of the article, and will be published as part of the article online and in PDF. The graphical abstract should be submitted for peer review as a separate file, selecting the appropriate file-type designation in the journal's online submission system. The file should be clearly named, e.g. graphical_abstract.tiff. See [this page](#) for guidance on appropriate file format and resolution for graphics. Please ensure graphical abstracts are in landscape format.

2H. Supplementary material

Supporting material that is not essential for inclusion in the main text of the manuscript, but would benefit the reader, can be made available as online-only content. The material should not be essential to understanding the conclusions of the paper, but should contain data that is additional or complementary and directly relevant to the article content. Such

information might include more detailed methods, extended data sets/data analysis, list of investigators, or additional figures.

All supplementary material must be provided in suitable electronic formats, in a separate file, in its final form. All files to be considered as supplementary material must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for publication. Please ensure that the files intended as supplementary material are clearly indicated as such upon submission and are referred to in the main manuscript.

- All supplementary material must be referenced in the main manuscript.
- Tables should be labelled as ‘Supplementary Table S1’, ‘Supplementary Table S2’ etc.
- Figures should be labelled as ‘Supplementary Figure S1’, ‘Supplementary Figure S2’ etc.
- Text (e.g. supplementary methods) should be labelled as ‘Supplementary Data S1’, ‘Supplementary Data S2’ etc.
- All supplementary tables, figures and data should have titles, as well as legends where appropriate.

Acceptable formats

A maximum of 10 files is acceptable to make up the supplementary material unit for the article. The maximum size per file should not exceed 1.5 MB, and files must be as small as possible, so that they can be downloaded quickly. An HTML index page is usually created to link in the supplementary material file(s). Please provide short (2-4 word) titles for each individual file - these will be used to create links to the files from the index page.

Recommendations:

- Pick a common cross-platform (PC, Mac, Linux/UNIX, Amiga etc.) format for your supplementary data to allow the greatest access.
- Provide text files in MS Word (.doc), HTML files (.html) or RTF (.rtf) format. Files supplied in Word or RTF may be used to create a PDF file.
- Provide spreadsheet files in MS Excel (.xls) or CSV format. Please send these to the editorial office to upload for you.
- Provide image files in tif, gif or jpg format. Images should be a maximum size of 640 x 480 pixels (9 x 6.8 inches at 72 pixels per inch).
- Provide movie or sound clips preferably in mpeg format.*

*Sound clips and movie clips can now be submitted via Editorial Manager, there is no limit on file size.

21. Clinical trial registration and reporting guidelines

Rheumatology requires the registration of all clinical trials in line with the ICMJE and WHO declarations. For submission of a randomized controlled trial, please provide the registration number of the trial and the name of the trial registry in the last line of the paper’s structured abstract. Randomized controlled trials (RCTs) should be reported according to the standard guidelines outlined in the [Consolidated Standards of Reporting Trials \(CONSORT\) statement](#).

Any manuscripts submitted to ICMJE journals reporting clinical trial data must contain a data sharing statement, indicating:

- Whether the authors intend to share individual de-identified participant data
- What specific data they intend to share
- What other study-related documents will be made available
- How the data will be accessible
- When and for how long they will be made available.

Furthermore, clinical trials that begin enrolling participants on or after *1 January 2019* must include a data sharing plan in the trial's registration if they wish to publish results in ICMJE journals. Any changes to the plan after registration must be disclosed in the data sharing statement when published.

- Systematic reviews or meta-analyses of RCTs should be based on the [Quality of Reporting of Meta-analyses \(QUOROM\) guidelines](#).
- Meta-analysis of observational studies should be developed according to the [Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology \(MOOSE\) guidelines](#).
- Reports of studies of diagnostic accuracy should be prepared according to the [Studies of Diagnostic Accuracy \(STARD\) guidelines](#).

For further information, see Statement from the [International Committee of Medical Journal Editors and the World Health Organization \(WHO\) International Clinical Trials Registry Platform](#).

To ensure the highest quality of research reporting, *Rheumatology* follows the [EQUATOR network](#) resource centre for good research reporting. *Rheumatology* strongly advises authors to follow the standard formats and guidelines provided.

2J. Style

Style and spelling

Oxford English spelling should be used. Authors whose first language is not English are requested to have their manuscripts checked carefully before submission. This will greatly help expedite the review process by helping to ensure that the academic content of the paper is fully understood by journal editors and reviewers. There are many specialist language editing companies that offer editing services and you can use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

Abbreviations

Standard SI units of measurement should only be used. For all other abbreviations please refer to the [journal-approved list](#).

Measurements

Measurements of length, height, weight and volume should be reported in metric units (metre [m], kilogram [kg], litre [l]) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in mmHg. All other measurements including laboratory measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI).

Materials

When quoting specific materials or proprietary drugs, authors must state in parentheses the name, town/city and state/country of the manufacturer. Drug names should only be referred to by their generic non-proprietary names.

Statistics

Statistical methods must be detailed and should conform to [published statistical guidelines](#).

3. Submitting your manuscript

All manuscripts are submitted and reviewed via ScholarOne

Manuscripts: <http://mc.manuscriptcentral.com/rheumatology>. All authors must have a ScholarOne Manuscript account. Please check if your co-authors already have accounts before creating new ones.

If authors have a registered ORCID ID, this should be entered into the relevant field during the submission process. If you do not have an ID, you can register one for free at <https://orcid.org>.

All manuscripts submitted for publication must be original, previously unpublished, and not under consideration for publication elsewhere. If previously published figures, tables or parts of text are to be included, the authors are responsible for obtaining the necessary permission from the copyright holder prior to submission. This permission should be included at the time of submission.

By submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author (only one corresponding author is permitted per submission) and that the Editorial Office and Oxford University Press (OUP) may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. Please notify the Editorial Office and OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication, OUP will contact you using the email address you have used in the submission process.

The Editorial Office may contact you with queries about your submission before your paper is assigned to an Associate Editor. Please reply to any queries as quickly as possible in order to keep your paper moving. If we do not receive a response from you after three reminder emails have been sent, your manuscript will be withdrawn.

4. Peer review process

All submissions will be reviewed by the Editorial team. Papers may be rejected without full peer review and remaining papers will be sent for external peer review. All submitted manuscripts are treated as confidential, and reviewers agree to also keep the material as confidential. *Rheumatology* operates a single-blind peer review process. Authors may be

required to produce data on which their manuscript is based, or any supporting documents such as ethical approval letters.

4A. Decision

Your manuscript will receive one of the following decisions:

- Reject before review
- Reject after review
- Minor revision
- Major revision
- Accept
- Transfer

In the case of a transfer decision, the manuscript is offered for transfer to our open access journal, *Rheumatology Advances in Practice* (<https://mc.manuscriptcentral.com/rheumap>). Authors of identified papers will be given the opportunity to indicate whether or not their manuscript should be transferred. If the authors agree to transfer their paper, there will be no need for re-submission. Any reviewer comments will also be transferred, resulting in reduced time to decision.

4B. Revision

If you receive a minor or major revision decision, you are granted 28 days to revise and re-submit your manuscript. If you require a longer revision period, please contact editorial@rheumatology.org.uk.

Conflict of interest forms

At the revision stage, we will ask the corresponding author to complete the conflict of interest form on behalf of all authors. The corresponding author should contact all authors to ensure the most up to date information is provided.

Patient consent forms

Rheumatology follows the [ICMJE guidelines for patient reporting](#). The patient must be shown the manuscript to be published, and they must also read and sign [this patient consent form](#). This consent form must be archived by the authors for seven years. In order to proceed with publication in *Rheumatology*, the authors must sign [this declaration](#) and enclose it with their submission. The paper will not be published without this confirmation.

4C. Appeals/Rebuttals

If you have reason to believe that the editorial process has not been fair or well-informed, you may submit an appeal via email to the Editorial Office (editorial@rheumatology.org.uk). The appeal should include:

- Author name

- Manuscript title
- Manuscript ID
- Decision date
- An explanation regarding why you feel that the decision was unfair
- Specific comments in relation to the reviewer reports
- Email and contact details

We will endeavor to respond to appeals as quickly as possible. We will consider one appeal per manuscript.

5. Publishing your manuscript

5A. Post-acceptance guidelines and production

Acceptance checklist

You may be contacted by the Editorial Office to submit any outstanding forms or files, and confirm any final small amendments to your manuscript. Please respond as soon as you can, so your paper can be transferred to Oxford University Press in a timely manner.

Proofs

Page proofs will be submitted to the corresponding author electronically. These should be checked thoroughly for any changes or typographic errors. It is the publisher's intent to review and correct the proofs and publish the accepted work as soon as possible. To achieve this, it is mandatory that all corrections are returned to OUP within 3 days. Subsequent additional corrections will not be possible, hence please ensure that all amendments are marked up comprehensively in the proofs.

Page charges

There is a page limit of 9 printed pages per article. For all pages over this limit the authors will be charged £95/\$170 per additional page.

Errata

Any significant errors will be corrected and an erratum published online and in the print publication. Please inform the Editorial Office as soon as you spot the error and provide details of the paper including authorship, title and manuscript number.

Offprints

The Publisher will supply free electronic access to each article. The details will be sent to the corresponding author. Printed offprints may be ordered at an extra cost at proof stage.

5B. Copyright and permissions

Authors must grant an exclusive licence to publish to the journal, published by Oxford University press on behalf of the British Society for Rheumatology. The licence agreement must be completed before publication online.

If previously published figures, tables or parts of text are to be included, the authors are responsible for obtaining the necessary permission from the copyright holder prior to submission. This permission should be included at the time of submission.

5C. Open access

Rheumatology authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open initiative](#), whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licences. RCUK/Wellcome Trust funded authors publishing in *Rheumatology* can use the Creative Commons Attribution licence (CC BY) for their articles.

Visit the OUP licensing website to find out more about [Creative Commons licences](#).

You can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. The open access charges are as follows:

- Regular charge: £2040/ \$3308 / €2702

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

Third-party content in open access papers

If you will be publishing your paper under an Open Access licence but it contains material for which you do not have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

- Title of content
- Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]
- This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.

Self-archiving and post-print policy

Authors may enter the post-print of their article in PubMedCentral, other subject repositories, or institutional repositories, but they must stipulate that public availability be delayed until 12 months after the first online publication. For further details on this policy, please consult the [OUP Author Self-archiving Policy](#).

Online access

Details of free online access will be sent to the corresponding author, who may then circulate them to co-authors.

5D. Availability of data and materials

A condition of publication in *Rheumatology* is that the authors agree to make materials, data and associated protocols promptly available to readers if requested. Where reagents are not available commercially, authors must make these freely available to academic researchers for their own use. If there are any restrictions on materials/data, authors must disclose this at the time of submission.

Databases that aggregate published data for the use of the scientific community are supported by *Rheumatology*. Before publication, large data sets (including atomic coordinates or electron microscopy maps for macromolecular structures, DNA or protein sequences, and microarray data) must be deposited in an approved database and an accession number provided for inclusion in the published article.

Useful links:

Genbank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>)

International Nucleotide Sequence Database Collaboration (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/collab/>)

EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>)

DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)

SWISS-PROT (<http://ca.expasy.org/sprot/>)

Worldwide Protein Data Bank (<http://www wwpdb.org>)

BioMag Res Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu>)

Electron Microscopy Data Bank (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/docs/emdb/index.html>)

MIAME (<http://fged.org/projects/miame/>)

ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>)

Gene names (<http://www.genenames.org/>)

If readers encounter authors who do not comply with this policy, please contact editorial@rheumatology.org.uk.

5E. Promoting your research

Publicity

Articles that are considered newsworthy may be selected for press release. If your institution intends to issue a press release about your article, please contact the Production Editor at rheumatology@oup.com after you have received your proofs to arrange an embargo date for the publication of your article.

Press releases are also issued by Oxford University Press for selected content. If you feel your article is suitable for a press release please highlight this to the editorial office, as soon as the article has been accepted.

Author interviews

Your paper may be selected for a podcast or video interview. If so, the Editorial Office will contact you to arrange an interview to discuss your paper. For examples of author interviews, see our [podcasts](#) and [videos](#).

Social media

Selected articles published in *Rheumatology* are shared on the [@RheumJnl](#) Twitter feed and Oxford University Press social media channels. Sharing your article online helps to increase the impact of your article. For useful tips and information, see our [social media guide for authors](#).

Tips to promote your research

Rheumatology is committed to disseminating research globally. Publishing in the journal ensures that your research will be discoverable, and read by a wide and diverse audience. To further extend your article's reach, and its [Altmetric score](#), you may want to consider carrying out some of the below tips.

- Add a link to your article in your email signature, on your institutional faculty page, LinkedIn and academic networking site profiles, or post it to a relevant forum
- Share a link to your research on your social media channels. To get the most out of social media, see our [social media guide for authors](#)
- Write about your articles on your blog, or become a guest author on another blog, such as the [OUPblog](#). For blog posts to contribute to your Altmetric score, make sure you include a direct link to your article in the blog post, and email support@altmetric.com to let them know about the post

6. Other

6A. Misconduct

Rheumatology takes publication ethics very seriously. If misconduct is found or suspected after the manuscript is published, the journal will investigate the matter and this may result in the article subsequently being retracted.

An article is reviewed for publication on the understanding that the work it represents has not been submitted for publication elsewhere. All authors will be required to submit a statement confirming that the manuscript represents original work that has not been published, accepted or is currently being considered for publication elsewhere except as an abstract. If you have submitted your manuscript and are awaiting a decision, please do not submit elsewhere. Duplicate submissions are a strain on reviewers and journal office resources.

Rheumatology is a member of the [Committee on Publication Ethics](#) (COPE) and is committed to the highest ethical standards in journal publishing. The Editor may refer cases of misconduct to COPE for advice. All identifying information is removed before a case is sent to COPE.

6B. Disclaimers

Advertising and sponsorship

Rheumatology displays adverts in both the print issue and online. The content of the Journal is independently decided from the advertising planned for the issue and is not made available to advertisers prior to its publication.

Advertisement in the Journal is neither a guarantee nor an endorsement by the British Society for Rheumatology, the Editors, the Editorial Board or Oxford University Press.

The Journal will publish adverts that meet appropriate legal requirements and are suitable for the Journal. All adverts are approved by the Editorial Office before publication. Advertisements must be factually accurate and should not be misleading or offensive. No advertiser is given exclusive rights to advertise on the website or in the Journal. The Editorial Office reserves the right to decline any advertisement.

The Journal occasionally publishes sponsored supplementary issues, which are fully peer reviewed. The editorial process is independent of funders or advertisers. If you have any comments about an advertisement in the Journal, please contact the Editorial Office (editorial@rheumatology.org.uk).

Material disclaimer

The opinions expressed in *Rheumatology* are those of the authors and contributors, and do not necessarily reflect those of the British Society for Rheumatology, the Editors, the Editorial Board, Oxford University Press or the organization to which the authors are affiliated.

Drug disclaimer

The mention of trade names, commercial products or organizations, and the inclusion of advertisements in the Journal do not imply endorsement by the British Society for Rheumatology, the Editors, the Editorial Board, Oxford University Press or the organization to which the authors are affiliated.

The Editors and publishers have taken all reasonable precautions to verify drug names and doses, the results of experimental work and clinical findings published in the Journal.

The ultimate responsibility for the use and dosage of drugs mentioned in the Journal and in the interpretation of published material lies with the medical practitioner, and the Editors and publishers cannot accept liability for damages arising from any errors or omissions in the Journal. Please inform the Editorial Office of any errors.

7. Frequently asked questions

Q. Am I allowed two corresponding authors?

A. No, we only permit one per article. Please decide who this should be before submitting to the journal.

Q. Can we have joint first or last authors?

A. No, but you are welcome to include a statement of equal contribution instead (see below).

Q. Can authors contribute equally to a paper?

A. Yes. On the manuscript, please use an * to indicate which authors have contributed equally on the title page, and add a statement e.g. *Dr John Smith and Dr Elaine Jones contributed equally to this paper.

Q. How do I check the status of my submission on ScholarOne Manuscripts?

A. Log in to your account and go to the 'Submitted Manuscripts' tab within your Author Center. There will be a

'Status' update. If you have any queries about your paper, please contact the Editorial Office, remembering to include your Manuscript ID number.

Q. Can I make a change to my paper after it has been submitted?

A. Depending on where your paper is in the ScholarOne system, and the nature of the query, the Editorial Office may be able to make changes on your behalf. Please email the Editorial Office with your manuscript ID and a description of the change required.

Q. Can I have an extension on my reviewer report or my manuscript revision?

A. The Editorial Office will deal with these queries on a case-by-case basis. Please contact the Editorial Office remembering to include your Manuscript ID, and how long you wish to have an extension for. The Editorial Office will then do their best to accommodate your wishes.

Q. I am having trouble adding certain files to my manuscript submission.

A. Please contact the Editorial Office who will be able to help you, including the Manuscript ID (if applicable) and the files that you wish to upload. If they are large files over 2MB, please send them to the Editorial Office using a free transfer service such as DropBox or WeTransfer.

Q. I have noticed a mistake on my paper after publication, what can I do to fix it?

A. Please send your corrections to the Editorial Office, who then liaise with the Production team at Oxford University Press on the next steps.

Q. How long will it take to peer review my manuscript?

A. *Rheumatology* aims to provide a quick service, without compromising a thorough peer review process. The exact time taken depends on many factors, such as responding to Editorial Office queries quickly, finding peer reviewers to accept a review request, how quickly reviews are returned. The usual length of the process is around 6-8 weeks but this may take longer on occasion.

Q. Is there a word limit on my manuscript?

A. Yes, please see our [article types](#) (section 2A). The word count applies to the main body of text only – that is from the first word of the introduction to the last word of the conclusion. Title pages, abstracts, disclosure and funding statements, acknowledgements, tables and figures and references do not count towards the word limit.

Q. Why has my manuscript been withdrawn?

A. Your manuscript may have been a duplicate submission, or the Editorial Office may have received no response to queries. On occasion, manuscripts are withdrawn because they do not meet our aims and scope. If you are unsure as to why your manuscript was withdrawn, please email editorial@rheumatology.org.uk with your manuscript ID number.

More FAQs and guidance can be found within the [Author Resource Centre](#).

