



# REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



## Artigo original

# Níveis de óxido nítrico mais elevados estão associados à atividade da doença em pacientes egípcios com artrite reumatoide



Adel Mahmoud Ali, Reem Abdelmonem Habeeb\*, Noran Osama El-Azizi, Dina Aziz Khattab, Rania Ahmed Abo-Shady e Rania Hamdy Elkabarity

Departamento de Medicina Interna, Divisão de Reumatologia e Departamento de Patologia Clínica, Universidade Ain Shams, Cairo, Egito

### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 10 de abril de 2013

Aceito em 6 de julho de 2014

On-line em 28 de setembro de 2014

Palavras-chave:

Artrite reumatoide (AR)

Estresse oxidativo

Óxido nítrico (NO)

### R E S U M O

**Introdução:** O estresse oxidativo produzido no interior de articulações inflamadas pode produzir fenômenos autoimunes e destruição articular. As espécies radicais com atividade oxidativa, incluindo espécies reativas de nitrogênio, representam mediadores de inflamação e de lesão cartilaginosa.

**Objetivos:** Avaliar o óxido nítrico sérico como marcador de estresse oxidativo em pacientes egípcios com artrite reumatoide e sua relação com a atividade da doença.

**Métodos:** 80 com artrite reumatoide foram divididos em dois grupos, de acordo com a pontuação DAS28: Grupo I: 42 pacientes com doença ativa, e Grupo II: 38 pacientes com doença inativa. Quarenta indivíduos equiparados por idade e gênero foram incluídos como grupo controle (Grupo III). Foram realizados exames laboratoriais de rotina e o óxido nítrico foi medido usando Elisa. Radiografias simples das mãos foram feitas para a pontuação do estado radiológico utilizando o método de Sharpe.

**Resultados:** A comparação do nível sérico de óxido nítrico entre os três grupos mostrou uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ). Obtiveram-se níveis significativamente mais elevados entre os pacientes com artrite reumatoide em comparação com os controles. Os níveis mais elevados foram obtidos em pacientes com a doença ativa (média  $\pm$  DP  $82,38 \pm 20,46$ ) em comparação com aqueles com a doença inativa ( $35,53 \pm 7,15$ ). O óxido nítrico no Grupo I exibiu uma correlação positiva significativa com a rigidez matinal ( $r = 0,45$ ), artrite ( $r = 0,43$ ), contagem de plaquetas ( $r = 0,46$ ), velocidade de hemossedimentação ( $r = 0,83$ ), proteína C-reativa ( $r = 0,76$ ) e Índice de Atividade de Doença ( $r = 0,85$ ). O óxido nítrico mostrou uma correlação positiva significativa ( $r = 0,43$ ) com as radiografias das mãos (índice de Sharpe) no Grupo I.

**Conclusão:** Observa-se um aumento nos níveis séricos de óxido nítrico em pacientes com artrite reumatoide. O óxido nítrico se correlaciona significativamente com a atividade da doença, marcadores inflamatórios e estado radiológico das articulações.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

\* Autor para correspondência.

E-mail: reemhabeeb@yahoo.com (R.A. Habeeb).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.07.003>

0482-5004/© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

## Higher nitric oxide levels are associated with disease activity in Egyptian rheumatoid arthritis patients

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Rheumatoid arthritis (RA)  
Oxidative stress  
Nitric oxide (NO)

**Background:** Oxidative stress generated within inflammatory joints can produce autoimmune phenomena and joint destruction. Radical species with oxidative activity, including reactive nitrogen species, represent mediators of inflammation and cartilage damage.

**Objectives:** To assess serum nitric oxide as a marker of oxidative stress in Egyptian patients with rheumatoid arthritis and its relation to disease activity.

**Methods:** 80 patients with rheumatoid arthritis were divided into 2 groups, according to the DAS-28 score: Group I: 42 patients with disease activity, and Group II: 38 patients with no disease activity. Forty age- and sex-matched individuals were included as control group (Group III). Routine laboratory investigations were done, and nitric oxide was measured using Elisa. Hand plain radiographies were done for radiological status scoring using the Sharp method.

**Results:** A comparison between nitric oxide in all three groups showed a highly significant difference ( $p < 0.001$ ), significantly higher levels were obtained among rheumatoid arthritis patients in comparison to controls, and higher levels were obtained in patients with active disease (mean  $\pm$  SD  $82.38 \pm 20.46$ ) in comparison to patients without active disease ( $35.53 \pm 7.15$ ). Nitric oxide in Group I showed a significant positive correlation with morning stiffness ( $r = 0.45$ ), arthritis ( $r = 0.43$ ), platelet count ( $r = 0.46$ ), erythrocyte sedimentation rate ( $r = 0.83$ ), C-reactive protein ( $r = 0.76$ ) and Disease Activity Score ( $r = 0.85$ ). Nitric oxide showed a significant positive correlation ( $r = 0.43$ ) with hand radiographies (Sharp score) in Group I.

**Conclusion:** There are increased levels of nitric oxide in the serum of patients with rheumatoid arthritis. Nitric oxide correlates significantly with disease activity, inflammatory markers and radiological joint status.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

## Introdução

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula produzida endogenamente que desempenha um papel crítico na sinalização celular, e que está envolvida em vários processos fisiológicos. O NO pode ter efeitos biológicos opostos, dependendo de condições ambientais e fisiopatológicas diversas.<sup>1</sup>

O estresse oxidativo produzido dentro de uma articulação inflamada pode provocar fenômenos autoimunes e destruição do tecido conjuntivo no interior da sinóvia. Espécies radicais com atividade oxidativa, que incluem espécies reativas de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio, representam os mediadores e efetores da lesão da cartilagem.<sup>2</sup>

O NO promove a mediação de muitas funções celulares diferentes no local da inflamação sinovial, como por exemplo a transdução de sinal, a função mitocondrial e a apoptose.<sup>3</sup> Ele surgiu como um mediador importante na sinóvia na artrite reumatoide (AR). Foi relatado o aumento dos níveis de NO no soro e no líquido sinovial em pacientes com AR, espondilite anquilosante e osteoartrite.<sup>4</sup>

O objetivo deste trabalho é avaliar o óxido nítrico sérico como marcador de estresse oxidativo em pacientes egípcios com artrite reumatoide e sua relação com a atividade da doença.

## Métodos

Em um estudo transversal, 80 pacientes com AR, diagnosticados de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology/European League against Rheumatism (ACR/EULAR)*,<sup>5</sup> foram divididos em dois grupos de acordo com a atividade da doença: Grupo I: 42 pacientes com doença ativa e Grupo II: 38 pacientes com doença inativa. Um terceiro grupo foi incluído, o Grupo III: 40 indivíduos saudáveis com idade e gênero correspondentes, como grupo controle. Todos os pacientes foram recrutados no Ambulatório de Reumatologia e na Enfermaria de Medicina Interna do Hospital Escola da Universidade Ain Shams. Foi obtido consentimento informado de todos os participantes. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Ain Shams. Os participantes receberam explicações sobre a natureza do estudo. Os procedimentos laboratoriais e radiológicos representam o tratamento padrão, não implicando em conflitos éticos. Coletou-se de todos os pacientes:

I. História de saúde detalhada e exame clínico e musculoesquelético minucioso, com avaliação da atividade da doença pelo instrumento DAS28-VHS.<sup>6</sup>

História detalhada da duração e progressão da doença, tendo sido avaliados os sinais e sintomas capitais de febre, perda de peso e fadiga, além de um exame musculoesquelético minucioso.

**Tabela 1 – Comparação entre os Grupos I e II, no que se refere a dados demográficos, clínicos e laboratoriais**

	Grupo I	Grupo II	P
<b>Dados demográficos</b>			
Idade, média (DP)	48,78 (12,41)	44,10 (10,54)	> 0,05
<b>Gênero, n (%)</b>			
Masculino	19 (45)	17 (45)	> 0,05
Feminino	23 (55)	21 (55)	> 0,05
Duração da doença (anos), média (DP)	5,48 (6,63)	6,59 (5,81)	> 0,05
<b>Manifestações clínicas</b>			
Emagrecimento, n (%)	16 (38)	15 (39)	> 0,05
Fadiga, n (%)	21 (50)	10 (26)	< 0,001
Febre, n (%)	4 (10)	0 (0)	> 0,05
Rigidez matinal, n (%)	36 (85)	13 (34)	< 0,001
<b>Dados laboratoriais</b>			
Hemoglobina, média (DP)	11,06 (1,64)	11,87 ± 1,61	> 0,05
Contagem total de leucócitos, média (DP)	7,68 (2,61)	7,12 ± 2,38	> 0,05
Plaquetas, média (DP)	382,81 (102,24)	261,14 ± 74,37	< 0,05
Velocidade de hemossedimentação (VHS), média (DP)	60,69 (24,32)	19,76 ± 5,29	< 0,001
Proteína C-reativa (PCR), média (DP)	24,48 (12,64)	8,52 ± 3,01	< 0,001
Fator reumatoide (FR), n (%)	36 (86)	30 (79)	> 0,05

Foi observada uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre os Grupos I e II no que se refere à fadiga (50% e 26%, respectivamente) e à rigidez matinal (85% e 34%, respectivamente). Foi observada uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre os Grupos I e II no que diz respeito à VHS e PCR, com níveis mais elevados para esses dois indicadores detectados no Grupo I.

A atividade da doença foi avaliada usando o DAS28-VHS. Valores  $\leq 2,6$  foram considerados como indicativos de ausência de atividade da doença.<sup>6</sup>

#### II. Exames laboratoriais:

##### a) Exames laboratoriais de rotina:

Hemograma completo;

VHS na primeira hora, estimada pelo método Western;

PCR (mg/dL, com titulação).

##### b) Exames imunológicos:

Fator reumatoide: medido usando técnica de aglutinação em látex em lamina para fator AR biótico, para determinação qualitativa do FR no soro.

##### c) Óxido nítrico sérico:

A determinação do NO foi realizada utilizando o ELISA (R & D Systems, Inc., Minneapolis, EUA). Este ensaio determina as concentrações de NO com base na conversão enzimática de nitrato para nitrito pela ação da nitrato-redutase. Um passo preliminar de desproteínização foi realizado utilizando o método de ultrafiltração; o filtro usado foi o Centrstart 1, fornecido pelo grupo Vivascience Sartorius ([www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)). A reação é seguida pela detecção colorimétrica de nitrito como produto corante anazo da reação de Griess.<sup>7</sup>

#### III. Exames radiológicos:

Foram realizadas radiografias simples das mãos e dos punhos para pontuação do dano radiológico, utilizando o método de Sharpe.<sup>8</sup>

#### Análise estatística

Os dados coletados foram codificados, tabulados e analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 17.0. Foi efetuada a descrição das variáveis qualitativas utilizando número e porcentagem.

O teste do qui-quadrado foi aplicado para comparação das variáveis qualitativas. Utilizou-se o teste exato de Fisher em lugar do teste de qui-quadrado quando se esperava  $\leq 5$  células. Empregou-se o teste t não pareado para comparar dois grupos independentes no que diz respeito às variáveis quantitativas. O coeficiente de correlação de Spearman e Person foi utilizado para classificar as diferentes variáveis entre si, positiva ou inversamente. O valor de  $p$  representou o nível de significância, em que  $p > 0,05$  foi considerado como não significativo (NS),  $p < 0,05$  como significativo (S) e  $p < 0,001$  como altamente significativo (AS).

#### Resultados

No Grupo I havia 23 mulheres e 19 homens. A idade variava de 27 a 63 anos, com média de  $48,78 \pm 12,41$  anos e duração média da doença de  $5,48 \pm 6,63$  anos. No Grupo II havia 21 mulheres e 17 homens. A idade variava de 28 e 65 anos, com média de  $44,10 \pm 10,54$  anos e duração média da doença de  $6,59 \pm 5,81$  anos. Não houve diferença significativa entre os dois grupos com relação a gênero, idade ou duração da doença.

A fadiga e a rigidez matinal foram significativamente mais frequentes no grupo I versus II ( $p < 0,001$ ). Os pacientes do Grupo I também tiveram valores de VHS e PCR significativamente maiores que os pacientes do grupo II ( $p < 0,001$ ) (tabela 1). Houve diferença significativa entre os grupos I e II com relação ao índice de Sharpe (tabela 2).

Ao comparar o nível de NO entre os três grupos, foram detectados níveis significativamente mais elevados entre os pacientes com AR em comparação com os controles. Os níveis mais elevados foram obtidos entre os pacientes com AR com doença ativa (Grupo I) (tabela 3).

A comparação entre o nível sérico de NO e vários parâmetros da doença no Grupo I mostrou uma correlação positiva significativa ( $p < 0,05$ ) com a rigidez matinal, artrite e contagem

**Tabela 2 – Comparação entre os Grupos I e II com relação ao índice radiográfico de Sharpe**

Índice de Sharpe	Grupo I		Grupo II		p
	n	%	n	%	
0	2	5	3	8	<0,05
1	4	10	16	42	<0,001
2	6	14	11	29	<0,01
3	18	43	5	13	<0,001
4	10	23	2	5	<0,001
5	2	5	0	0	<0,01

**Tabela 3 – Comparação entre os Grupos I, II e III, com relação ao nível sérico de NO**

NO sérico	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Valor p
Média ± DP	82,38 ± 20,46	35,53 ± 7,15	14,25 ± 4,09	<0,001

Níveis significativamente mais elevados de NO foram detectados entre os pacientes com AR, em comparação com os controles, e os níveis mais elevados foram obtidos entre os pacientes com AR e com doença ativa (Grupo I).

de plaquetas, e uma correlação positiva altamente significativa ( $p < 0,001$ ) com a atividade da doença, VHS e PCR (tabela 4). Por outro lado, não foi demonstrada correlação positiva com o índice de Sharpe das radiografias das mãos ( $p < 0,05$ ) no Grupo I (fig. 1). Não foi possível detectar qualquer correlação significativa entre o NO e o índice de Sharpe das radiografias das mãos.

## Discussão

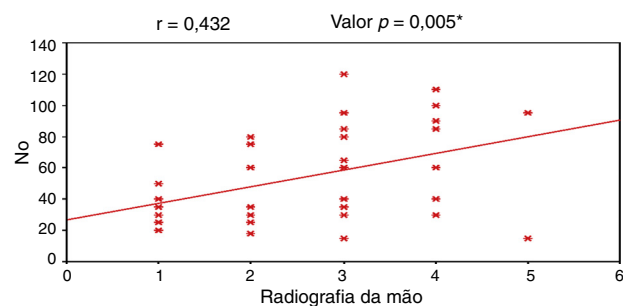
A inflamação e a lesão tecidual relacionadas com o estresse oxidativo têm sido implicadas na patogênese da AR. O estresse oxidativo e a diminuição do estado antioxidante são as marcas registradas em pacientes com AR, como tem sido observado nos últimos anos.<sup>9</sup> A lesão tecidual dependente do NO tem sido implicada em uma variedade de doenças reumáticas, incluindo a AR.<sup>10</sup>

**Tabela 4 – Correlação entre o nível sérico de NO e vários parâmetros da doença no Grupo I**

Variável	r	Valor p
Idade	0,231	>0,05
Duração da doença	-0,252	>0,05
Rigidez matinal	0,453	<0,05
Artrite <sup>a</sup>	0,432	<0,05
Plaquetas	0,458	<0,05
VHS	0,832	<0,001
PCR	0,763	<0,001
Atividade da doença	0,846	<0,001

VHS, velocidade de hemossedimentação; PCR, proteína C-reativa. O NO demonstrou uma correlação positiva significativa ( $p < 0,05$ ) com a rigidez matinal, a artrite e a contagem de plaquetas, e uma correlação positiva altamente significativa ( $p < 0,001$ ) com a atividade da doença, a VHS e a PCR.

<sup>a</sup> Contagem de 28 articulações sensíveis e/ou inchadas.



**Figura 1 – Correlação entre o nível sérico de NO e o índice de Sharpe das radiografias das mãos no Grupo I. O NO demonstrou uma correlação positiva significativa com o índice de Sharpe nas radiografias das mãos ( $p < 0,05$ ).**

O presente estudo avaliou o nível de NO como um marcador do estresse oxidativo em pacientes com AR e sua relação com a atividade da doença. O estudo recrutou 80 pacientes com AR: 42 pacientes com doença ativa (Grupo I) e 38 com doença inativa (Grupo II).

Os pacientes com doença ativa queixavam-se significativamente mais ( $p < 0,001$ ) de rigidez matinal e de fadiga em comparação com aqueles com doença inativa. Isso provavelmente se deve ao fato de que as manifestações clínicas, como por exemplo a rigidez matinal, têm sido há muito tempo associadas com a atividade da doença em pacientes com AR, e por isso espera-se que valores significativamente mais elevados sejam obtidos em pacientes com artrite reumatoide ativa.<sup>11</sup>

No presente estudo, tanto a VHS quanto a PCR estavam significativamente mais elevadas no grupo com a doença ativa ( $p < 0,001$ ). Embora a PCR pareça ser o melhor teste para a medição da fase aguda, deve-se considerar que a VHS é sensível a imunoglobulinas e ao FR, de modo que este último parâmetro é melhor para medir a gravidade geral (em comparação com a PCR), embora seja uma medida não tão boa para a inflamação.<sup>12</sup> Em um estudo que teve por objetivo avaliar a utilidade clínica das medidas de PCR e VHS na avaliação de pacientes com AR, verificou-se que esses dois indicadores foram preditores significativos da contagem de articulações inchadas ( $p < 0,001$  para ambas as variáveis).<sup>13</sup>

Neste estudo, a comparação entre os níveis séricos de NO nos três grupos revelou uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ), sendo que foram encontrados níveis significativamente mais elevados entre pacientes com AR em comparação com os controles; e foram obtidos níveis ainda mais elevados em pacientes com AR ativa (82,38 ± 20,46) em comparação com o grupo com a doença inativa (35,53 ± 7,15). Os níveis séricos de NO no Grupo I revelaram uma correlação positiva significativa com a rigidez matinal ( $r = 0,45$ ), artrite ( $r = 0,43$ ) e contagem de plaquetas ( $r = 0,46$ ) e encontrou-se uma correlação positiva altamente significativa entre o NO e a VHS ( $r = 0,83$ ) e a PCR ( $r = 0,76$ ), bem como com o DAS ( $r = 0,84$ ).

Na comparação entre os dois grupos no que se refere ao dano radiológico avaliado pelo índice de Sharpe, foi observada uma diferença significativa entre os dois grupos ( $p < 0,001$ ). Os níveis de NO mostraram uma correlação positiva significativa ( $r = 0,43$ ) com o índice de Sharpe das radiografias das mãos apenas no Grupo I, mas não foi possível detectar correlação

entre o NO e o índice de Sharpe das radiografias das mãos no Grupo II. Alguns estudos demonstraram uma relação longitudinal entre a atividade da doença e o quadro radiográfico.<sup>14</sup> Um estudo concluiu que o nível de atividade da doença, bem como a duração da remissão, afetam a progressão subsequente do dano radiográfico em pacientes com AR.<sup>15</sup> Por conseguinte, tendo em vista que a atividade da doença pode ser um dos produtores de lesão nas articulações e de progressão radiográfica na AR, seria de se esperar que, uma vez que o NO está correlacionado com a atividade da doença, também se correlacionaria com os danos radiográficos em pacientes com a doença ativa, como foi detectado no presente estudo. Contrastando com isso, outros estudos concluíram que, apesar da melhora clínica e da remissão em pacientes com AR ativa, a progressão radiográfica continua ao longo do tempo, em razão do processo inflamatório subjacente.<sup>16</sup>

Dentro da mesma linha de nosso estudo, várias pesquisas demonstraram um aumento do nível sérico de NO em pacientes com AR, em comparação com grupos controle.<sup>17,18</sup> Um estudo sugeriu que a produção de nitrato e nitrito é aumentada em pacientes com AR, em comparação com indivíduos saudáveis.<sup>4</sup>

Foi demonstrado que o NO regula as funções dos linfócitos T em condições fisiológicas; mas a superprodução de NO pode contribuir para a disfunção dessas células. O aumento na produção de NO em pacientes com AR pode ser decorrente do aumento da atividade da NO sintase.<sup>19</sup>

Do mesmo modo, foi detectada uma correlação significativa entre as concentrações séricas de nitratos e o número de articulações sensíveis, número de articulações inchadas, pontuação DAS e nível de PCR.<sup>20</sup> Os resultados sugerem que estes achados podem servir como parâmetros confiáveis da atividade da doença em pacientes com RA.

Embora tenha sido sugerido que as espécies reativas de nitrogênio são produzidas no interior das articulações inflamadas de pacientes com AR e que os níveis se correlacionam diretamente com a atividade da doença,<sup>21</sup> vários estudos concluíram que o nível de NO não se correlaciona com a VHS e nem com a PCR, e que havia uma correlação não significativa entre os níveis séricos de cada uma das espécies de nitrogênio e a duração da doença ou VHS, como um marcador da atividade da doença.<sup>18,22</sup>

O estresse oxidativo produzido em uma articulação inflamada pode contribuir para o fenômeno autoimune e para a destruição do tecido conjuntivo em pacientes com AR. A produção de NO e de prostaglandina E2 a partir dos condrocitos articulares provavelmente contribui para a destruição da cartilagem observada em casos de artrite.<sup>23</sup> No presente estudo, foi detectada uma correlação positiva significativa entre o NO sérico e o quadro radiológico em ambos os grupos com AR, sugerindo um papel para o NO não só na atividade da doença, mas também nos danos articulares.

No presente estudo transversal realizado em uma coorte de pacientes egípcios com AR, o NO não só foi detectado em níveis significativamente mais elevados em pacientes com AR ativa, mas esse indicador também estava significativamente correlacionado com vários parâmetros e com a atividade da doença. O estudo também incluiu uma avaliação radiológica das mãos utilizando o índice de Sharpe, que também apresentou uma correlação significativa com os níveis de NO.

No entanto, principalmente devido à limitação imposta pelo seu modelo transversal, os resultados do estudo talvez estejam demonstrando um efeito causal do NO, ou simplesmente podem estar refletindo o estado inflamatório da atividade da doença.

Finalmente, pode-se concluir que há um aumento do nível sérico de NO em pacientes com AR, e que o nível de NO se correlaciona significativamente com a atividade da doença, bem como com o status radiológico das articulações. Isto poderia sugerir o envolvimento de radicais livres não só no processo inflamatório da AR, mas também na destruição das articulações. Novos protocolos terapêuticos, baseados na correção dos níveis de estresse oxidativo, poderão se revelar eficazes em restringir a progressão da doença, com limitação das deformidades.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

## REFERÊNCIAS

- Li H, Wan A. Apoptosis of Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes: Possible Roles of Nitric Oxide and the Thioredoxin 1. *Mediators Inflamm*. 2013;953462. Epub 2013 Apr 3.
- Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Status of Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2009;12:29-33.
- Phillips DC, Dias HK, Kitas GD, Griffiths HR. Aberrant reactive oxygen and nitrogen species generation in RA: causes and consequences for immune function, cell survival and therapeutic intervention. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:743-85.
- Ersoy Y, Ozerol E, Baysal O, Temel I, MacWalter RS, Meral U, et al. Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:76-8.
- Aletaha D, Neogi T, Silman A, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep;69:1580-8.
- Aletaha D, Smolen J. The Simplified Disease Activity Index and the Clinical Disease Activity Index: a review of usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23 5 Suppl 39:S100-8.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982 Oct;126:131-8.
- Sharp JT, Young DY, Bluhm GB, Brook A, Brower AC, Corbett M, et al. How many joints in hands and wrists should be included in a score of radiologic abnormalities used to assess rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum*. 1985;28:1326-35.
- Ajay K, Pranshi M, Neelima S. Study of non-enzymatic antioxidant and lipid peroxide levels in rheumatoid arthritis. *UJMD*. 2012;1:10-3.
- Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, et al. Central role of nitric oxide in pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:210.
- Tamas MM, Felea I, Rednic S. How much difference does the age at onset make in early arthritis patients? Comparison between the ACR 1987 and the ACR/EULAR 2010 classification

- criteria for rheumatoid arthritis at the time of diagnosis. *Rheumatol Int.* 2013 Nov;33:2881-4.
12. Wells G, Becker JC, Teng J, Dougados M, Schiff M, Smolen J. Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:954-60.
  13. Cynthia S, Mahboob U, Eric L. Which Measure of Inflammation to Use? A Comparison of Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein Measurements from Randomized Clinical Trials of Golimumab in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 2010;36:1606-10.
  14. Landewé R, Van der Heijde D. Radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23 Suppl. 39:S63-8.
  15. Aletaha D, Funovits J, Breedveld FC, Sharp J, Segurado O, Smolen JS. Rheumatoid arthritis joint progression in sustained remission is determined by disease activity levels preceding the period of radiographic assessment. *Arthritis Rheum.* 2009;60:1242-9.
  16. Markatseli TE, Voulgari PV, Alamanos Y, Drosos AA. Prognostic Factors of Radiological Damage in Rheumatoid Arthritis: A 10-year Retrospective Study. *J Rheumatol.* 2010;38:44-52.
  17. Savas G, Arzu S, Eda C. Nitric oxide and superoxide dismutase in rheumatoid arthritis: Correlation with disease activity. *Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care.* 2012;6:1.
  18. Aida A, Mohamed A. Serum Protein Carbonyl Content, Total Thiol and Nitric Oxide in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of American Science.* 2011;7:683-6.
  19. Mäki-Petäjä KM, Cheriyan J, Booth AD, Hall FC, Brown J, Wallace SM, et al. Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. *Int J Cardiol.* 2008;129:399-405.
  20. Onur O, Akinci AS, Akbiyik F, Unsal I. Elevated levels of nitrate in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2001;20:154-8.
  21. Khan F, Siddiqui A. Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Chim Acta.* 2006;370:100-7.
  22. Marwan S, Samir A, Khalid S. Serum nitric oxide and peroxynitrite levels in adult sero-positive rheumatoid arthritis treated with disease modifying antirheumatic drugs: a preliminary report. *Turk J Med Sci.* 2010;40:191-7.
  23. Amin A, Attur M, Abramson S. Cox2, NO and cartilage damage and repair. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;2:447-53.